

**FERNANDA PAULA RONCON SANTANA**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS  
COMPOSTOS SAKURANETINA, EUGENOL E BIS-EUGENOL  
NA ATENUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PULMONARES EM  
MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Química, ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Máximo Prado

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. João H. G. Lago

**Diadema**

**2019**

Santana, Fernanda Paula Roncon

Avaliação dos mecanismos de ação dos compostos sakuranetina, eugenol e bis-eugenol na atenuação das alterações pulmonares em modelo de asma experimental / Fernanda Paula Roncon Santana -- Diadema, 2019.

162 f.

Tese (Doutorado em Ciências Programa de Pós-Graduação em Biologia Química) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: Carla Máximo Prado

Co-Orientador: João Henrique Ghilardi Lago

1. Asma. 2. Flavonoide, 3. Modelo Experimental. 4. Eugenol. 5. Deidrodieugenol. I. Título.



**Serviço Público Federal  
Universidade Federal de São Paulo  
Pró – Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**

**ATA DE REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO  
DE DOUTORADO**

Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove, reuniu-se no **Anfiteatro José Alencar** - Rua São Nicolau, 210, 5º andar - Centro – Diadema, a Comissão Julgadora para a **DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**, solicitada por **FERNANDA PAULA RONCON SANTANA**, aluna do Programa de Pós-Graduação em **BIOLOGIA QUÍMICA**, que apresentou Tese de Doutorado sob o Título: "**AValiação DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPOSTOS SAKURANETINA, EUGENOL E BIS-EUGENOL NA ATENUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PULMONARES EM MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL**". A referida Comissão esteve constituída pelos Doutores:

**TITULARES**

- **Ana Cristina B. Faloppa**  
Universidade de São Paulo
- **Luciana Chagas Caperuto**  
Universidade Federal de São Paulo
- **Maria Luiza Vilela Oliva**  
Universidade Federal de São Paulo
- **Niels Olsen Saraiva Câmara**  
Universidade de São Paulo
- **Carla Máximo Prado (Presidente da Banca)**  
Universidade Federal de São Paulo

**SUPLENTES**


- **Suzete M. Cerutti**  
Universidade Federal de São Paulo
- **Fernanda Degobbi T. Quirino Dos Santos Lopes**  
Universidade de São Paulo


A Presidente da Banca, Profa. Dra. **Carla Máximo Prado** inicia a sessão dando a palavra à candidata, que

dispõe de vinte a quarenta minutos no máximo, para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador dispõe de trinta minutos no máximo, para arguição, bem como à candidata para resposta. Tendo a candidata respondido todas às arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora, emitiram seus Pareceres.

Drs.:

Ana Cristina B. Faloppa  Aprovada ☒ Reprovada ( )


Luciana Chagas Caperuto  Aprovada ☒ Reprovada ( )


Maria Luiza Vilela Oliva  Aprovada ☒ Reprovada ( )


Niels Olsen Saraiva Câmara  Aprovada ☒ Reprovada ( )

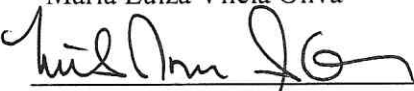
Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera a aluna **FERNANDA PAULA RONCON SANATANA** (~~APROVADA~~) a receber o título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS** pela Universidade Federal de São Paulo. E por estarem de acordo, assinam a presente ata.

São Paulo, 28 de março de 2019.

  
Ana Cristina B. Faloppa

  
Luciana Chagas Caperuto

  
Maria Luiza Vilela Oliva

  
Niels Olsen Saraiva Câmara

  
Carla Máximo Prado ( Orientadora / Presidente)

Dedico esta tese

Aos meus pais, Carla Fernanda e José Carlos,

Ao meu marido Renato,

Pelo apoio incondicional em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Durantes todo o processo que levou a realização deste trabalho, tive o privilégio de conhecer pessoas fantásticas, que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para o eu que sou hoje. E a essas pessoas que gostaria de agradecer:

Primeiramente, agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Máximo Prado. Me orgulho muito de tê-la como orientadora nesses 7 anos (desde o mestrado). Muito obrigada pela sua orientação, paciência, ensinamentos e conselhos. Admiro muito como pessoa, orientadora, professora e mãe.

Agradeço, em especial, aos meus pais, que sempre me apoiam incondicionalmente e que me encorajam em todos os aspectos da vida. Obrigada pelo amor incondicional e por serem meu porto seguro.

Ao Renato, namorado, noivo e marido, por vivenciar todos os momentos de alegria e de tristeza, altos e baixos. E por estar sempre ao meu lado, me ajudando e me apoiando. Obrigada por ser meu companheiro de vida.

Aos meus sogros, cunhado, tios e primos, muito obrigada pela motivação e apoio sempre!

À minha amiga Mariana, por estar sempre à disposição, para sair, comer, conversar e tudo mais. Obrigada por fazer parte de todos os momentos nesses muitos e muitos anos de amizade.

À minha amiga Fernanda, obrigada pelos conselhos, troca de figurinhas acadêmicas, almoços, conversas com fuso britânico e por estar sempre presente em minha vida.

Ao Rafael Cossi, meu “IC” favorito, agora mestrando. Obrigada por todos os dias nos laboratórios juntos, pelos milhares experimentos, brownies, nossos jogos de cara ou coroa para comer Mc ou marmita. Você tornou esta trajetória mais alegre!

Às meninas Rosana Banzato, Nathalia M. Pinheiro, Márcia Bittencourt, obrigada pelos anos de amizade e pelos bons tempos de bancada. E a todos os alunos, que estão presentes e os que passaram no grupo, pela convivência e por transformarem o dia a dia do laboratório muito mais agradável e divertido.

Ao Prof. João Lago, por toda ajuda com a parte química e extração dos compostos, sempre disposto a tirar minhas dúvidas. Obrigada também a Simone Grecco, por me acompanhar na extração da sakuranetina.

À Fátima Carrasqueira, secretária da pós-graduação, pela paciência e boa vontade em responder minhas perguntas e por ajudar nas questões burocráticas.

Às Professoras Luciana Caperuto, Suzete Cerutti e Mônica Telles, por me acolherem como uma de suas alunas, por disponibilizarem seus laboratórios e tempo para dúvidas e problemas. Vocês me inspiram a seguir a vida acadêmica. A todos os funcionários, alunos e pesquisadores da UNIFESP- campus Diadema, pelo aprendizado e companheirismo.

Ao Prof. Lídio Gonçalves, por disponibilizar o laboratório para os experimentos com a linhagem celular RAW.

Ao Aruanã Pinheiro, amigo e grande professor, que veio pela parceria dos nossos orientadores, obrigada por todos os momentos juntos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iolanda Tibério, pelo carinho e estar sempre disposta a ajudar.

À Clarice Olivo, a *The Flash* dos experimentos, obrigada por ajudar nos experimentos.

À Mariângela Macchione e a Kelly Yoshisaki, pelos ensinamentos sobre cultura de células e pelas colaborações.

Ao Davi Ferreira, por sempre dar aquele jeitinho e fazer de tudo para ajudar e pelas conversas que deixavam as leituras de lâminas sempre mais leve.

Ao Luiz Afonso, responsável pelo biotério, pela atenção e cuidados com os animais.

À Fernanda Lopes, Beatriz Saraiva, Fernanda Arantes, Rosana Paz, Edna Leick e ao Prof. Milton, por me ajudarem a tirar minhas dúvidas e também no que precisasse no laboratório. A todos os funcionários, alunos e pesquisadores do LIM 20-FMUSP, pela disponibilidade de me ajudar sempre que possível, e por contribuírem para meu crescimento.

Aos membros da banca examinadora de defesa desta tese, agradeço pelo aceite do convite e pela disponibilidade de tempo para a leitura e avaliação desta tese. E aos membros da banca de qualificação pelas contribuições.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) uma vez que o presente trabalho foi realizado com este apoio - Código de Financiamento 001.

À FAPESP que financiou os experimentos realizados por meio de auxílio regular n. 2018/06088-0.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*  
*Madre Teresa de Calcutá*

## Resumo

Os avanços na fisiopatologia e a melhora do tratamento da asma ainda não foram suficientes para reduzir a alta prevalência, e principalmente a elevada morbidade e os altos custos gerados para o Sistema Único de Saúde. Muitos pacientes, em especial os que tem asma grave, não respondem ao tratamento convencional. Embora uma gama de novas substâncias venha sendo estudadas para o tratamento da asma, pouco se sabe sobre os exatos mecanismos de ação e possíveis efeitos adversos destes compostos na redução da inflamação pulmonar, o que é essencial para que possa ser um dia utilizado na clínica. Assim, os objetivos do presente estudo foram:

1. Avaliar os mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de *Baccharis retusa* (Asteraceae) em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas;
2. Avaliar os efeitos anti-inflamatórios e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol, em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas.

Para tanto, animais foram submetidos a exposições à ovoalbumina (OVA) ou salina intraperitoneal (dias 0 e 14) e inalatória (dias 22, 24, 26 e 28). O tratamento com sakuranetina, eugenol, bis-eugenol, dexametasona ou veículo foi administrado por 8 dias consecutivos a partir do 22º dia. No dia 28, os animais foram anestesiados, coletado o lavado broncoalveolar e o pulmão. Nos animais tratados com eugenol e deidrodieugenol foi avaliado a função pulmonar. Foram avaliadas, por ELISA e Western Blotting, as citocinas e as vias da MAPK, da JAK2/STAT3/SOCS3 e o VACHT, um componente do sistema colinérgico. Possíveis alterações patológicas no fígado dos animais e os efeitos *in vitro* destes compostos em macrófagos RAW 264,7 também foram elucidados. A sakuranetina atenuou a inflamação pulmonar por inibição da fosforilação de STAT3, da MAPK e de IL-17, além de reduzir os níveis de VACHT

no pulmão de animais sensibilizados. Em um segundo momento, observamos que o bis-eugenol apresentou um efeito melhor em relação ao eugenol e a dexametasona, reduzindo a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de neutrófilos a hiperresponsividade brônquica. Os efeitos destes dois compostos foram associados a inibição das vias da MAPK, de STAT3, SOCS3 e de VChT. Não houve efeito tóxico no fígado *in vivo*, e em células RAW 264,7 *in vitro*. Ainda estes compostos inibiram a liberação de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico produzidos pelas RAW 264,7 *in vitro*. Em conjunto, nossos dados sugerem que a sakuranetina e o bis-eugenol tem efeito anti-inflamatório, além do antioxidante já associado a eles. Esses compostos atuam na inibição de diferentes vias de sinalização celular, como MAPK e STAT3, envolvidas no controle da resposta inflamatória. Ainda, parecem ter um efeito importante na via Th17, que é um importante mecanismo envolvido na asma grave. Estes achados reforçam que estes compostos podem ser ferramentas terapêuticas importantes a serem utilizadas em pacientes com asma.

Palavras chaves: Asma; Flavonoide; Modelo Experimental; Eugenol; Deidrodieugenol.

## Abstract

Advances in the pathophysiology and improvement of asthma treatment have not yet been sufficient to reduce the high prevalence, and especially the high morbidity and high costs generated for the Sistema Único de Saúde. Many patients, especially those with severe asthma, do not respond to conventional treatment. Although a range of new substances have been studied for the treatment of asthma, little is known about the exact mechanisms of action and possible adverse effects of these compounds in the reduction of pulmonary inflammation, which is essential for them to be used in the clinic. Thus, the aims of the present study were: 1. To evaluate the mechanisms of action involved in the anti-inflammatory effect of sakuranetin, isolated from the aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae), in an experimental model of chronic allergic airway inflammation; 2. To evaluate the anti-inflammatory effects and mechanisms of action of eugenol and its dimer, dehydrodieugenol, in an experimental model of chronic allergic airway inflammation. For this, animals were exposed to ovalbumin (OVA) or saline. Treatment with sakuranetin, eugenol, dehydrodieugenol, dexamethasone or vehicle was given for 8 consecutive days from the 22nd day. On day 28, the animals were anesthetized, the bronchoalveolar lavage and lung were collected. In the animals treated with eugenol and dehydrodieugenol, pulmonary function was evaluated. By ELISA and Western Blot, cytokines, and VACHT, a component of the cholinergic system, the MAPK pathway and the JAK2/STAT3/SOCS3 pathway were evaluated. Possible pathological changes in the liver of the animals and *in vitro* effects of these compounds on RAW 264,7 macrophages were also elucidated. Sakuranetin attenuated lung inflammation by inhibiting the phosphorylation of STAT3, MAPK and reducing IL-17 and VACHT levels in the lungs of sensitized animals. Then, we observed that dehydrodieugenol had a better effect than eugenol and dexamethasone, reducing

the inflammatory response, including the recruitment of neutrophils and also bronchial hyperresponsiveness. The effects of these two compounds were associated with MAPK, STAT3 and SOCS3 and VACHT pathways inhibition. There was no toxic effect on the liver *in vivo*, and RAW 264,7 cells *in vitro*. These compounds also inhibited the release of proinflammatory cytokines and nitric oxide produced by these cells. In conclusion, taken together our data suggest that sakuranetin and dihydrodieugenol have an anti-inflammatory effect, in addition to the anti-oxidant effect already associated with them. They act in the inhibition of different cellular signaling pathways, such as MAPK and STAT3, involved in the control of the inflammatory response. Still, they appear to have a significant effect on the Th17 pathway, which is an important mechanism involved in severe asthma. These findings reinforce that these compounds may be important therapeutic tools to be used in patients with asthma.

Keywords: Asthma; Flavonoid; Experimental Model; Eugenol; Dehydrodieugenol.

## Lista de Ilustrações

Figura 1. Esquema da fisiopatologia da asma alérgica.	23
Figura 2. Esquema representativo da via de sinalização da MAPK.	28
Figura 3. Esquema representativo da via de sinalização JAK2/STAT3/SOCS3.	31
Figura 4. Esquema representativo do sistema colinérgico anti-inflamatório.	33
Figura 5. Estrutura química do flavonoide sakuranetina.	36
Figura 6. Representação molecular dos compostos eugenol e seu dímero bis-eugenol.	40
Figura 7. Protocolo esquematizado da sensibilização com ovalbumina.	47
Figura 8. Sakuranetina (SK) reduz a área do epitélio brônquico assim como a produção de muco ácido no epitélio brônquico e nasal.	67
Figura 9. Sakuranetina (SK) inibiu citocinas Th2 e Th17 em homogenato pulmonar.	69
Figura 10. O tratamento com a sakuranetina (SK) inibiu componentes da via MAPK.	71
Figura 11. Sakuranetina (SK) inibiu a ativação de STAT3 fosforilada no homogenato pulmonar.	73
Figura 12. Sakuranetina (SK) reduziu a expressão da proteína VACHT no homogenato pulmonar.	74
Figura 13. Toxicidade in vivo no tecido do fígado com os grupos do subprojeto 1.	75
Figura 14. Viabilidade celular em diferentes doses de sakuranetina em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264,7.	76
Figura 15. Sakuranetina (SK) reduziu óxido nítrico e citocinas IL-1 $\beta$ e IL-6 em linhagem celular RAW 264,7.	78
Figura 16. Parâmetros avaliados para escolha da dose de tratamento do eugenol (EUG) (5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg).	80
Figura 17. Efeito do eugenol (EUG) e do bis-eugenol (BIS) na responsividade brônquica.	82
Figura 18. Efeito do eugenol (EUG) e do bis-eugenol (BIS) na responsividade do tecido pulmonar e vias aéreas.	84
Figura 19. Tratamentos com eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) inibiram citocinas Th2 e Th17 no pulmão (pg/mg de proteína).	89
Figura 20. Efeito do eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) na via MAPK.	91
Figura 21. Efeito do eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) na via JAK2/STAT3/SOCS3.	93
Figura 22. Bis-eugenol (BIS) reduziu a expressão da proteína VACHT no homogenato pulmonar. expressão da proteína VACHT.	94
Figura 23. Viabilidade celular em diferentes doses de eugenol e bis-eugenol (deidrodieugenol) em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264,7.	95
Figura 24. Porcentagem de inibição de radicais livres dos compostos eugenol e bis-eugenol.	96
Figura 25. As doses de 5 e 50 $\mu$ g/mL de eugenol e de bis-eugenol reduziram o óxido nítrico.	97
Figura 26. Todas as doses de eugenol e bis-eugenol reduziram a expressão de IL-1 $\beta$ e de IL-6.	98

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Grupos experimentais do subprojeto 1.</i>	45
<i>Tabela 2 Grupos experimentais do subprojeto 2 – Curva dose resposta ao tratamento com eugenol. Doses de 5, 10 e 20 mg/kg.</i>	46
<i>Tabela 3 Grupos experimentais do subprojeto 2 – Tratamentos com eugenol e bis-eugenol.</i>	46
<i>Tabela 4: Especificações dos anticorpos utilizados para a realização do Western Blotting.</i>	57
<i>Tabela 5. Efeito do tratamento com a sakuranetina nos parâmetros inflamatórios e resposta imune.</i>	65
<i>Tabela 6. Efeito do tratamento com eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) nos parâmetros inflamatórios e resposta imune.</i>	87
<i>Tabela 7. Resumo dos dados dos efeitos do tratamento com sakuranetina no modelo experimental de asma.</i>	108
<i>Tabela 8. Resumo dos dados dos efeitos do tratamento com eugenol e bis-eugenol no modelo experimental de asma.</i>	115

## Lista de Abreviações

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Alumen	Hidróxido de alumínio
BIS	Bis-eugenol
BSA	Albumina de soro bovino
ChAT	Colina acetiltransferase
ChT1	Transportador de colina alta afinidade
CP	Controle positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DX	Dexametasona
EM	Espectrometria em massa
ERK	Quinase reguladora extracelular, do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Ers	Elastância do sistema respiratório
EUG	Eugenol
GINA	Iniciativa Global para asma, do inglês <i>Global Initiative for Asthma</i>
Gtis	Resistência do tecido pulmonar
H&E	Hematoxilina e eosina
Htis	Elastância do tecido pulmonar
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
JAK	Janus quinase, do inglês <i>Janus associated kinase</i>
JNK	Quinase Jun N-terminal, do inglês <i>Jun N-terminal kinase</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
OD	Densidade ótica, do inglês <i>optical density</i>
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
OVA	Ovoalbumina
PAS/AB	Ácido periódico-Schiff/azul de alcian, do inglês <i>Periodic acid-Schiff/alcian blue</i>
Paw	Pressão de abertura das vias aéreas
PBS-T	Tampão fosfato-salina com Tween
Ptr	Pressão traqueal
RANTES	Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada, do inglês <i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
Raw	Resistência das vias aéreas
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rrs	Resistência do sistema respiratório
SAL	Salina



SFB	Soro Fetal Bovino
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SK	Sakuranetina
SOCS3	Supressor de sinalização de citocinas 3, do inglês <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
SPCCC	Do inglês, <i>Spiral Coil Column Chromatography</i>
STAT	Sinalizador e ativador de tradução e transcrição, do inglês <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS-T	Tampão tris-salina com Tween
Th	Células T auxiliaadoras, do inglês <i>T helper</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrose factor</i>
TYK2	Tirosina quinase 2
VACht	Transportador vesicular de acetilcolina
Zrs	Impedância do sistema respiratório

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>19</b>
1.1	Asma .....	19
1.1.1	Definição e diagnóstico.....	19
1.1.2	Epidemiologia .....	20
1.1.3	Fisiopatologia.....	21
1.1.4	Tratamentos.....	25
1.2	Vias de sinalização e envolvimento na fisiopatologia da asma .....	27
1.2.1	Via MAPK .....	27
1.2.2	JAK2/STAT3/SOCS3.....	29
1.2.3	Asma e sistema colinérgico .....	32
1.3	Modelos experimentais de asma .....	34
1.4	Compostos fitoquímicos .....	35
1.4.1	Sakuranetina.....	35
1.4.2	Eugenol e bis-eugenol .....	38
1.5	Justificativa e Hipótese:.....	40
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>42</b>
2.1	Objetivo geral .....	42
2.2	Objetivos específicos .....	42
2.2.1	Subprojeto 1 .....	42
2.2.2	Subprojeto 2 .....	42
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>43</b>
3.1	Coleta, isolamento e caracterização dos compostos extraídos de plantas 43	
3.1.1	Sakuranetina.....	43
3.1.2	Eugenol e bis-eugenol .....	44
3.2	Grupos Experimentais.....	45
3.2.1	Modelo de inflamação alérgica crônica de vias aéreas .....	47
3.2.2	Tratamento com sakuranetina, eugenol e bis-eugenol .....	48
3.3	Contagem de leucócitos no sangue .....	49
3.4	Mecânica respiratória .....	49
3.5	Coleta do lavado broncoalveolar (LBA) .....	51
3.6	Lavado da Medula Óssea .....	52
3.7	Coleta do pulmão, fígado, baço e timo .....	52
3.7.1	Coloração de PAS/AB .....	53

3.8	Dosagem de IgE, IgG1 e IgG2a OVA-específica .....	53
3.9	Quantificação das proteínas no pulmão .....	54
3.10	Dosagem de citocinas no pulmão (ELISA) .....	55
3.11	Expressão das vias de sinalização no pulmão .....	56
3.12	Atividade antioxidante por DPPH .....	58
3.13	Cultura de Celular de RAW 264,7 .....	58
3.13.1	Ensaio de Citotoxicidade por MTT -Viabilidade Celular.....	59
3.13.2	Dosagem de Óxido Nítrico .....	60
3.13.3	Expressão gênica por qPCR .....	60
3.14	Análise Estatística .....	62
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>63</b>
4.1	Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de <i>Baccharis retusa</i> (Asteraceae), em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas .....	63
4.1.1	A sakuranetina inibe a exacerbação da resposta alérgica e inflamatória em animais com asma experimental.....	63
4.1.2	A sakuranetina reduz a área do epitélio brônquico e o muco ácido no epitélio nasal e brônquico em animais com asma experimental .....	66
4.1.3	A sakuranetina inibe citocinas de perfil Th2 e Th17 no pulmão de animais com asma experimental .....	68
4.1.4	A sakuranetina inibiu a fosforilação dos três componentes da via MAPK no pulmão de animais com asma experimental.....	70
4.1.5	A sakuranetina inibiu a fosforilação de STAT3 no pulmão de animais com asma experimental.....	72
4.1.6	A sakuranetina reduziu os níveis proteicos de VAcT no pulmão de animais com asma experimental .....	74
4.1.7	O tratamento com sakuranetina não induz alterações morfológicas no fígado de animais com asma experimental.....	75
4.1.8	A sakuranetina não induz toxicidade <i>in vitro</i> em células RAW 264,7 ....	76
4.1.9	A sakuranetina não captura radicais livres pelo método de DPPH.....	76
4.1.10	A sakuranetina reduz a produção de NO em células RAW 264,7 estimuladas com LPS .....	77
4.1.11	A sakuranetina reduz a expressão de IL-1 $\beta$ e IL-6 em células RAW 264,7 estimuladas com LPS .....	77
4.2	Avaliação das ações anti-inflamatórias e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas.....	79
4.2.1	Curva dose resposta ao eugenol para determinação da melhor dose do tratamento.....	79

4.2.2	O bis-eugenol reduz a responsividade brônquica em animais com asma experimental .....	81
4.2.3	O bis-eugenol reduz a resposta alérgica e inflamatória em animais com asma experimental.....	85
4.2.4	Eugenol e bis-eugenol inibem citocinas de perfil Th2 e Th17 no pulmão de animais com asma experimental.....	88
4.2.5	O bis-eugenol reduz a fosforilação da MAPK no pulmão de animais com asma experimental.....	90
4.2.6	O bis-eugenol reduz a fosforilação de STAT3 e SOCS 3 em pulmão de animais com asma experimental .....	92
4.2.7	O bis-eugenol reduz a expressão de VACHT no pulmão de animais com asma experimental.....	94
4.2.8	Eugenol e bis-eugenol não induzem toxicidade in vitro em células RAW 264,7	95
4.2.9	Eugenol e bis-eugenol inibem a liberação de radicais livres.....	95
4.2.10	Eugenol e bis-eugenol reduzem a produção de NO em células RAW 264,7 estimuladas com LPS .....	96
4.2.11	Eugenol e bis-eugenol reduzem a expressão de IL-1 $\beta$ e IL-6 em células RAW 264,7 estimuladas com LPS .....	97
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>99</b>
5.1	Subprojeto 1: Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de <i>Baccharis retusa</i> (Asteraceae), em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas .....	99
5.2	Subprojeto 2: Avaliação das ações anti-inflamatórias e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas .....	109
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>116</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>117</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>126</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Asma

#### 1.1.1 Definição e diagnóstico

A asma é uma doença heterogênea, que atinge indivíduos de diferentes idade e sexo, sendo mais prevalente em crianças. A asma pode ser revertida espontaneamente ou com tratamento, no entanto, quando não controlada limita a qualidade de vida do indivíduo e em alguns casos pode levar a óbito (BATEMAN et al., 2008).

Segundo a *Global Initiative for Asthma* (GINA), a asma pode ser definida como: “Uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por uma inflamação crônica nas vias aéreas. É caracterizada pelo histórico de sintomas respiratórios, tais como sibilo, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam ao longo do tempo e intensidade, juntamente com a limitação do fluxo aéreo expiratório variável”.

As manifestações clínicas apresentadas na asma são provenientes de uma condição crônica, onde ocorre um distúrbio do mecanismo normal de reparo das vias aéreas, alterações inflamatórias recorrentes com recrutamento de células como eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, aumento da secreção de muco, hiperresponsividade brônquica e pela perda da função pulmonar. A persistência da inflamação crônica resulta em remodelamento pulmonar com prejuízo ainda maior da função pulmonar (MURPHY; O'BYRNE, 2010).

Existem diversos fatores genéticos e ambientais envolvidos no desenvolvimento da asma que estão associados a hipersensibilidade a uma variedade de estímulos. A atopia é um exemplo de predisposição genética, caracterizada pelo aumento da

resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) frente a alérgenos comuns do ambiente, predispondo para o desenvolvimento da asma em crianças e que geralmente persiste na vida adulta (DULLAERS et al., 2012).

Entre os fatores ambientais, destacam-se aqueles relacionados à pelos de animais domésticos, ácaros e baratas, pólen, compostos químicos como perfumes, inalação de poluentes atmosféricos e a fumaça de cigarro. Além disso, a asma também pode ser desencadeada por outros fatores como o uso de anti-inflamatórios não-esteroides, obesidade, exercício físico e fatores emocionais (KESKIN et al., 2012; RÖNMARK et al., 2005; STENFORS et al., 2004).

O diagnóstico da asma se baseia pelo histórico dos sintomas característicos como dispneia, chiado e demais descritos acima. Uma vez identificado os sintomas, é necessário realizar o teste de espirometria como apoio diagnóstico, que consiste na verificação do volume e da capacidade pulmonar do paciente. Ainda, a asma pode apresentar diferentes fenótipos que incluem a asma alérgica, grave, resistente a corticosteroides, decorrente de exposição de poluentes ambientais, fumaça de cigarro e obesidade (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

### 1.1.2 Epidemiologia

Ao longo dos anos, o número de casos de asma vem aumentando pelo mundo, atingindo principalmente cidades com alto desenvolvimento socioeconômico por terem maior número de habitantes, áreas com pouca ventilação e tendência do aumento da higiene, que evita a exposição precoce a microrganismos na infância (TSE; HORNER, 2008), além da má qualidade do ar nestes grandes centros urbanos, decorrente da emissão de automóveis e indústrias (KIM; BERNSTEIN, 2009; ZORA

et al., 2013). Entretanto, a asma também está presente em países em desenvolvimento, uma vez que mais de 80% de mortes por asma ocorrem em países de baixa e médio-baixa renda (WHO, 2019).

Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos de todas as idades, etnias e países são afetados pela asma no mundo (WHO, 2019). Nos Estados Unidos, existem cerca de 26,5 milhões de asmáticos, sendo que ocorreram 3,6 mil mortes de indivíduos asmáticos em 2016 (CDC, 2019).

No Brasil, cerca de 6,4 milhões de brasileiros foram acometidos pela asma em 2015, e mais de 100 mil internações no SUS foram registradas associadas a esta doença, sendo nas regiões Sul e Sudeste do Brasil está a maior parte da população afetada (DATASUS, 2019). Além disso, no ano de 2014, de acordo com o Sistema de Informações Hospitalares (SIH), as internações por asma geraram um custo de 57,2 milhões para a rede pública do país (DATASUS, 2019).

Sendo assim, a asma é uma doença que gera grande preocupação a saúde pública, tanto financeiramente quanto pela perda de produtividade e redução das atividades diárias dos pacientes asmáticos, que em geral fazem parte da faixa etária economicamente ativa. Desta forma, embora a mortalidade relativa não tenha subido nos últimos anos, o número absoluto e os gastos com esta doença aumentaram, o que faz de interesse público o estudo de novos alvos e ferramentas terapêuticas, além do melhor entendimento da sua fisiopatologia.

### 1.1.3 Fisiopatologia

O fenótipo mais prevalente da asma é estudado por pesquisadores é a forma alérgica da doença, que inicia com processo de sensibilização seguido de uma

resposta tardia com persistência da inflamação. No processo de sensibilização, as células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas presentes na mucosa brônquica, processam os alérgenos inalados e apresentam seus fragmentos peptídeos ligados à molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005; KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010). Em indivíduos que tenham uma predisposição genética, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em linfócitos de classe Th2 e produzem diversas citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam os linfócitos B a produzir imunoglobulina E (IgE) (LLOYD; HESSEL, 2010), fase conhecida como sensibilização alérgica (DULLAERS et al., 2012).

A IgE é uma das principais moléculas associadas ao desenvolvimento de alergias, não somente a indução, mas também a manutenção da resposta inflamatória. Além disso, está relacionada aos níveis de gravidade da asma (DULLAERS et al., 2012). Quando ocorre a reexposição ao alérgeno, a IgE ligar-se a receptores de membrana de mastócitos e basófilos e induz a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórias como histamina, citocinas e leucotrienos. Esses mediadores promovem o aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e produção de muco, gerando os sintomas que caracterizam a resposta asmática. (GINA, 2018) (Figura 1).

Os eosinófilos são células características da asma alérgica e estão associadas a obstrução brônquica e ao remodelamento pulmonar (Figura 1). Os eosinófilos, recrutados por respostas associadas a um perfil Th2, liberam diversos mediadores pró-inflamatórios também de perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL13) e alguns de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-10). A IL-13 está associada à hipersecreção de muco e à hiperplasia de células do epitélio brônquico em modelos de asma e em pacientes (ORDOÑEZ et al., 2001;



ZHU et al., 1999). A IL-4, produzida por linfócitos Th2 e também por mastócitos e eosinófilos (VOEHRINGER; SHINKAI; LOCKSLEY, 2004), pode induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão facilitando o extravasamento de eosinófilos (SCHLEIMER et al., 1992).

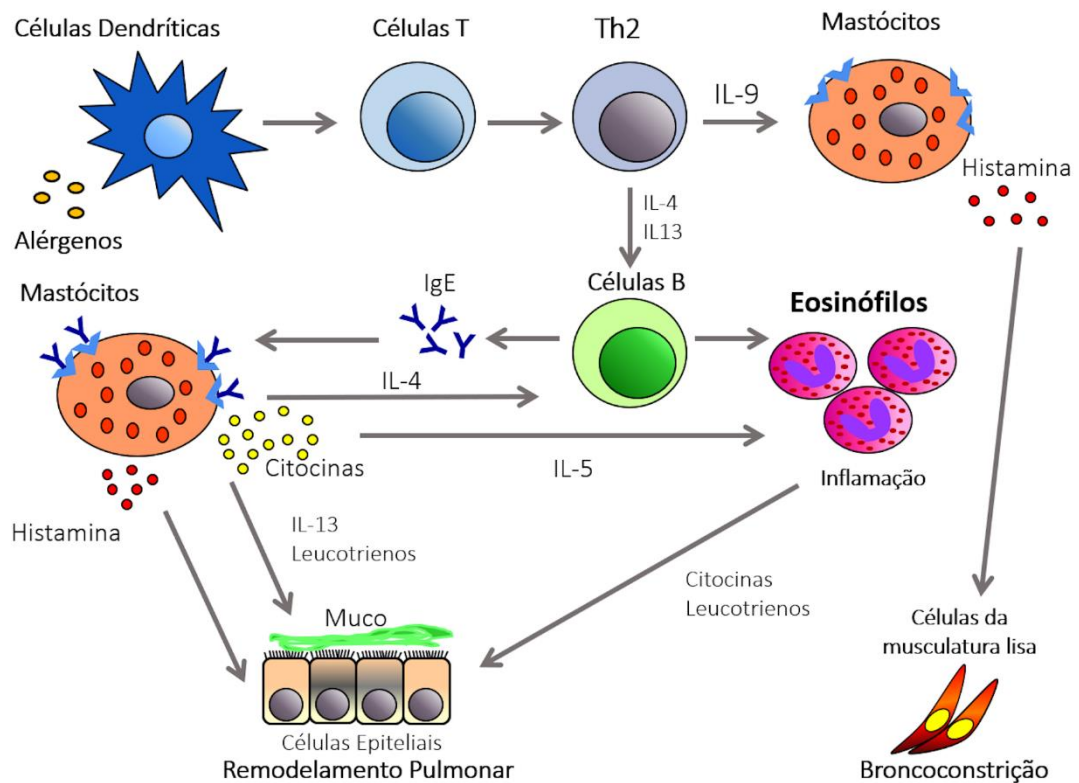


Figura 1. Esquema da fisiopatologia da asma alérgica. Células dendríticas capturam os antígenos inalados e estimulam a diferenciação de linfócitos para perfil Th2. Os linfócitos Th2 liberam citocinas como IL-4 e IL-13 e recrutam eosinófilos. Essas citocinas estimulam a produção de IgE pelos linfócitos B. A IgE produzida na mucosa se liga aos receptores de alta e baixa afinidade de mastócitos e basófilos presentes na mucosa das vias aéreas e levam a degranulação destas células seguidas da síntese de mediadores e citocinas inflamatórias, que causam os sintomas da hipersensibilidade imediata, como extravasamento do plasma e contração da musculatura lisa. A produção de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5, e IL-13) inicia a resposta da fase tardia com ativação e recrutamento das células inflamatórias tais como macrófagos e eosinófilos. IL-4 e IL-13 ainda causam hiperplasia das células caliciformes e produção excessiva de muco.

Uma quimiocina de perfil Th2, a RANTES (do inglês, *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*), recrutadora de eosinófilos está associada também com o recrutamento de linfócitos, monócitos e basófilos. Concentrações

elevadas de RANTES foram observadas em pacientes asmáticos, associada à gravidade da doença, demonstrando um importante papel de RANTES na patogênese da asma (GIUFFRIDA et al., 2014; KESKIN et al., 2012).

Baseado na teoria do desequilíbrio da resposta Th1 e Th2 na asma, há um desvio para resposta Th2, e desta forma citocinas de classe Th1 são algumas vezes encontradas em menor quantidade (CHEN et al., 2014; LV et al., 2016). Este desequilíbrio interfere na inflamação, na hiperreatividade e no remodelamento brônquico (HAMID; TULIC, 2009). Entretanto, algumas citocinas de perfil Th1, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), também tem sido apontadas como envolvidas na patogênese da asma, particularmente em casos mais graves (HASEGAWA et al., 2017; LAJOIE-KADOCH et al., 2006) A IFN- $\gamma$  ativa macrófagos e também está envolvida na regulação de proteínas do MHC tipo I e II e na apresentação de antígenos, além de ser capaz de inibir o crescimento celular e a apoptose (AKKOC, TUNC, 2008).

Recentemente, vem sendo estudado a diferenciação dos linfócitos T auxiliares (Th0) para Th17 em uma resposta alérgica. A IL-17 é uma citocina envolvida na produção de IL-6, prostaglandina E2, proliferação de células T e crescimento de diferenciação de CD34 em humanos (LV et al., 2016). Esta citocina parece estar também envolvida na ampliação de respostas de perfil Th2 (HASEGAWA et al., 2017; WAKASHIN et al., 2008) e em casos de asma grave e resistente ao corticosteroide (AKDIS et al., 2016). Alguns estudos utilizando modelos experimentais demonstraram a importância da via Th17 na asma, e a inibição de IL-17 parece ser um importante alvo terapêutico nesta doença (DOS SANTOS et al., 2018).

Desta forma, pode-se afirmar que o fator fisiopatogênico mais importante na asma é a inflamação que, por sua vez, está fortemente associado com a

hiperresponsividade das vias aéreas e a seus sintomas clínicos (BRANNAN, 2010). A inflamação está presente em pacientes com asma de início recente, em pacientes com formas leves da doença e mesmo entre os assintomáticos. Sabe-se que a persistência da resposta inflamatória leva a alterações estruturais no pulmão. Neste sentido, o remodelamento pulmonar, caracterizado principalmente por fibrose peribrônquica, hipertrofia do músculo liso, e deposição de colágeno assim como desarranjo do sistema de fibras elásticas, está associado a uma diminuição da função pulmonar observado em pacientes asmáticos ao longo dos anos (MAUAD; BEL; STERK, 2007). Um fato importante é que na maioria das vezes o processo de remodelamento brônquico não é totalmente revertido com os tratamentos convencionais como corticosteroides (GRZELA et al., 2015)

#### 1.1.4 Tratamentos

No tratamento da asma, os pacientes devem ser informados sobre a importância da aderência correta ao protocolo proposto, os fatores de risco e a prevenção das crises para manter o controle clínico da doença. O tratamento recomendado para pacientes asmáticos é o uso de corticosteroide preferencialmente inalatório associado a broncodilatadores de longa duração, especialmente  $\beta_2$ -agonistas, com o intuito de reduzir o processo inflamatório e melhorar a função pulmonar, respectivamente. Ainda são opções de tratamento antagonistas dos receptores muscarínicos da acetilcolina e os antileucotrienos, que são benéficos em alguns casos e as doses administradas variam de acordo com o nível de gravidade da doença (GINA, 2018).

Como existe diversos fenótipos de asma, o seu tratamento tem sido dividido em 5 etapas, e cada paciente é locado de acordo com seu tratamento atual e o nível de controle de suas exacerbações (SBPT, 2012).

Na etapa 1, são utilizadas medicações para alívio do sintoma da doença e utiliza-se para pacientes que tem sintomas ocasionais e de curta duração (2 ou menos por semana). Na etapa 2, são utilizados corticosteroides inalatórios em doses baixas ou antileucotrienos. Na etapa 3 é utilizada uma associação de um corticosteroide inalatório em doses baixas com um  $\beta$ 2-agonista inalatório de ação prolongada ou também pode-se aumentar a dose do corticosteroide inalatório. Na etapa 4, o tratamento consiste na combinação de corticosteroide inalatório em doses médias ou altas com um  $\beta$ 2-agonista de ação prolongada. Na etapa 5, adiciona-se corticosteroide oral às outras medicações de controle já referidas, sendo utilizada somente para pacientes com asma não controlada na etapa 4, que tenham limitação de suas atividades diárias e frequentes exacerbações e cientes de potenciais efeitos adversos (SBPT, 2012).

O tratamento deve ser ajustado de acordo com o estado de controle dos sintomas. Uma vez que a asma não esteja controlada com o tratamento atual, deve-se subir uma etapa sucessivamente até que o controle seja alcançado. Justamente, quando a asma se encontra controlada, as doses dos medicamentos podem ser reduzidas com o objetivo de minimizar custos e diminuir possíveis efeitos colaterais do tratamento (SBPT, 2012).

Pacientes com asma grave e de difícil controle muitas vezes não respondem ao uso de corticosteroides inalatórios (ITO; CHUNG; ADCOCK, 2006) e necessitam de altas doses sistêmicas, o que tem associação direta a diversas comorbidades como a diabetes, glaucoma, tuberculose, entre outras (ERNST; SUISSA, 2012). Além disso,

ainda assim a asma pode não ser controlada, necessitando de internações e uso de oxigenioterapia. Estes pacientes são aqueles que geram maiores custos e que apresentam alta morbidade e mortalidade. Desta forma o estudo de novas estratégias terapêuticas é de fundamental importância.

## 1.2 Vias de sinalização e envolvimento na fisiopatologia da asma

Diversos mecanismos de sinalização intracelular têm sido estudados tanto na fisiopatologia da asma quanto como vias de ação de drogas utilizadas no tratamento desta doença. O estudo dessas vias de sinalização é de extrema importância para entendermos os mecanismos de ação anti-inflamatória de potenciais compostos fitoquímicos em doenças.

### 1.2.1 Via MAPK

Vários estímulos extracelulares provocam respostas biológicas específicas devido a ativação de uma vasta gama de cascatas de sinalização, que induzem a inflamação, e a produção de mediadores inflamatórios. A família da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) é caracterizada por três principais componentes: proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK (ERK1/2 ou p42/p44), proteína quinase ativada por estresse (JNK / SAPK – do inglês, *Jun N-terminal kinase*) e proteína quinase p38 MAPK (SUN et al., 2013). Os componentes JNK e p38, são ativados por lesões como estresse hiperosmótico, choque térmico, irradiação UV e por citocinas inflamatórias, já a ERK desempenha um papel importante na apoptose

e expressão de citocinas (HAN et al., 1994; KUJIME et al., 2000; ROUSE et al., 1994; ZHANG et al., 1997). Um esquema desta via está representando na Figura 2.

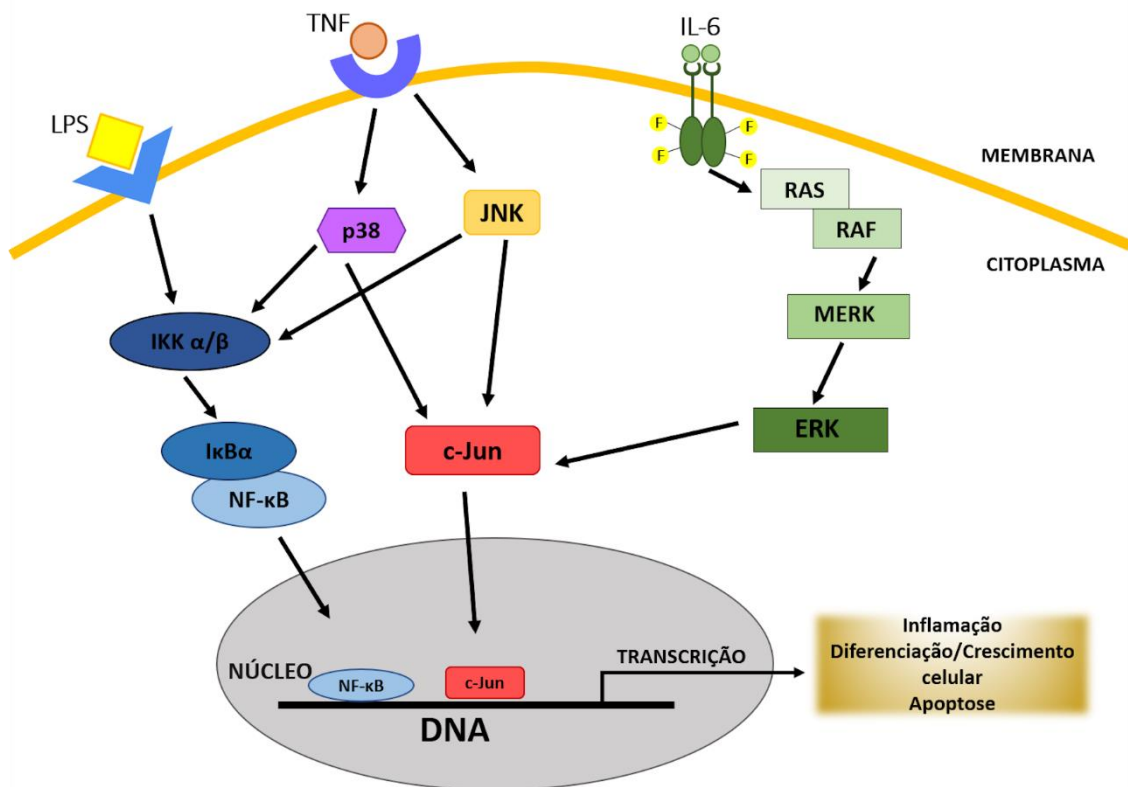


Figura 2. Esquema representativo da via de sinalização da MAPK. p38, ERK1/2 e JNK podem atuar em atividades como proliferação celular (fisiológico e patológico), apoptose, resposta inflamatória, produção de citocinas entre outros e consiste em uma cascata de fosforilações que geram fatores de transcrição que vão resultar na ativação de mediadores pró-inflamatórios. Modificado de Dong, Roger e Flavell (2002).

Na asma, a cascata da MAPK está envolvida na ativação de células do sistema imune e liberação de diversos mediadores (CHRISTIANSON; ALAM, 2013), embora o papel desta via não esteja totalmente elucidado. Alguns autores demonstraram que a via da MAPK está envolvida na produção de eotaxina pelas células do músculo liso estimuladas por citocinas como IL-4 e IL-13, sabidamente envolvidas na resposta alérgica (MOORE et al., 2002). Além disso, sabe-se que a p38 e ERK regulam IL-5 e outras citocinas (DONG; DAVIS; FLAVELL, 2002) enquanto a JNK parece ser relevante no deslocamento de uma resposta associada a IgE (CHIALDA et al., 2005).

Em modelos experimentais de asma diversos compostos fitoquímicos inibem a MAPK (LIU et al., 2015; YANG et al., 2011). Em pacientes com asma, os níveis da atividade da MAPK p38 no sangue aumentam de acordo com a gravidade da doença (SOUTHWORTH et al., 2018; YU et al., 2010)

A ativação dos componentes da via MAPK estimula a cascata de proteínas quinase que se translocam para o núcleo e ativam a transcrição de genes pró-inflamatórios. O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que está relacionado a ativação de citocinas pró-inflamatórias, é um dos componentes de transcrição ativado pela via da MAPK (VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009) (Figura 2).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição bem descrito e que está envolvido na fisiopatologia da resposta inflamatória, podendo ser um alvo terapêutico em doenças inflamatórias como a asma. Já foi demonstrado seu aumento em eosinófilos de pacientes asmáticos (HOPPENOT et al., 2015) e diversos drogas que tem efeito anti-inflamatório o fazem por inibição de NF- $\kappa$ B (BITTENCOURT-MERNAK et al., 2017; PINHEIRO et al., 2017; TOLEDO et al., 2013). A inibição destas vias de sinalização parecem ser uma estratégia terapêutica importante no tratamento de diversas doenças inflamatórias, e pode ser considerado como alvo futuro no tratamento da asma.

### 1.2.2 JAK2/STAT3/SOCS3

Membros da via de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) parecem ter uma função importante na asma, uma vez que atuam nas vias de transdução de sinal e / ou transcrição gênica. A fim de compreender os mecanismos fundamentais da patologia da asma, estudos têm sido feitos para identificar possíveis

associações genéticas envolvidas na fisiopatologia desta doença (MORALES et al., 2010).

As JAKs (do inglês, *janus kinase*) pertencem a uma família de proteínas responsáveis pela regulação do crescimento celular e respostas imunes (MURRAY, 2007). A proteína JAK é responsável pelo início de diferentes respostas celulares, interagindo com diferentes proteínas e ativando ou inibindo diferentes fatores de transcrição (LU et al., 2008). Quatro tipos de proteínas desta família já foram identificadas e nomeadas como JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina kinase 2, (TYK2) (VILLARINO et al., 2015).

Os quatro tipos de JAKs acima citados, podem ativar sete tipos de STATs (do inglês, *signal transducers and activators of transcription*) identificadas em mamíferos, que são as STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6 (MURRAY, 2007). Em resumo, a ligação de citocinas no receptor JAK2 induz uma modificação conformacional que tem como consequência a fosforilação do receptor de tirosina, permitindo a fosforilação da proteína STAT3 que se liga a outra STAT3 migrando para o núcleo (VAINCHENKER; CONSTANTINESCU, 2013). Uma vez translocada para o núcleo, a STAT3 induz o aumento da transcrição de diversos genes, em sua maioria pró-inflamatório (BROMBERG, 2001) (Figura 3).

Por outro lado, a ativação de STAT3 também estimula a produção de uma proteína supressora da liberação de citocinas, a SOCS3 (do inglês, *Suppressor of cytokine signaling 3*), que tem função anti-inflamatória e age como feedback negativo, inibindo a própria via JAK2/STAT3 (Figura 3). Desta forma, é consenso que esta via de transcrição, pode ter tanto efeitos anti-inflamatórios (SEKI et al., 2003; SIMEONE-PENNEY et al., 2007) como pró-inflamatórios (BROMBERG, 2001; SHEA-DONOHUE et al., 2010).



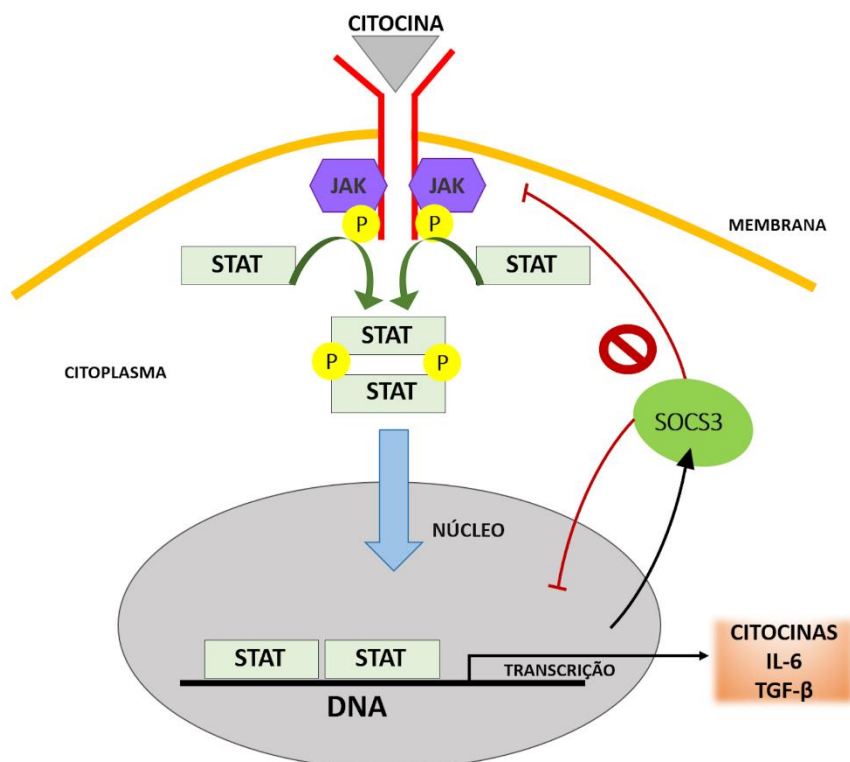


Figura 3. Esquema representativo da via de sinalização JAK2/STAT3/SOCS3. a ligação de citocinas no receptor JAK2 induz uma modificação conformacional que fosforila receptor de tirosina, permitindo que a proteína STAT3 se ligue a outra STAT3 e migram para o núcleo. Uma vez translocada para o núcleo, a STAT3 induz o aumento da transcrição de diversos genes, em sua maioria pró-inflamatória e estimula a produção de SOCS3 que atua com um feedback negativo na ativação de STAT3, induzindo uma resposta anti-inflamatória. Modificado de Cai et al., (2015).

Assim, o papel exato da via JAK2/STAT3/SOCS3 ainda foi pouco estudado e é bastante controverso (GAVINO et al., 2016; YANG et al., 2017). Parece que os níveis de proteína JAK/STAT aumentam em modelos de asma, e em crianças de até 6 anos de idade (LOISEL et al., 2016; YANG et al., 2017) e em alguns estudos associam esta via com a asma grave (PU et al., 2018; SUN et al., 2018). O papel da STAT6 no desenvolvimento da asma tem sido bem caracterizado, e está relacionada com a liberação de IL-4, IL-13 e IgE (VALE, 2016). No entanto, outros estudos demonstram também a participação da STAT3 na asma, uma vez que ela pode ser ativada pela citocina IL-13 (BHATTACHARJEE et al., 2013).

A inibição de STAT3 parece prevenir a inflamação pulmonar e a diferenciação de células Th2 em modelo de asma experimental (GAVINO et al., 2016). Embora SOCS3 seja inibidor de STAT, e fosse esperado que seu aumento induzisse um efeito benéfico no controle da resposta inflamatória, o silenciamento do gene SOCS3 em eosinófilos de pacientes asmáticos reduz sua função (ZAFRA et al., 2015) e, além disso, a SOCS está envolvida na diferenciação de células Th (YIN; LIU; DAI, 2015).

Desta forma fica claro que embora seja reconhecido na literatura que a via JAK/STAT/SOCS tenha um papel importante na modulação da resposta inflamatória na asma, o exato papel destas moléculas ainda precisa ser melhor esclarecido.

### 1.2.3 Asma e sistema colinérgico

O sistema colinérgico está envolvido em diversas funções fisiológicas do organismo e foi identificado como uma via que interfere na resposta inflamatória (BLALOCK, 2002; TRACEY, 2002). A detecção de componentes do sistema colinérgico, tais como a acetilcolina (ACh), o transportador de colina de alta afinidade (ChT1), a colina acetiltransferase (ChAT), o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), e receptores de ACh em células inflamatórias de vias aéreas sugerem uma importante participação do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças pulmonares (WESSLER; KIRKPATRICK, 2001).

Diversos trabalhos já demonstraram a importância do sistema colinérgico anti-inflamatório no controle da resposta inflamatória sistêmica e também local (JEREMIAS et al., 2016; PINHEIRO et al., 2015; SANTANA et al., 2019). A ACh, ao se ligar nos receptores nicotínicos (nAChR), inibe a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo e ativa

a via JAK2/STAT3/SOCS3, impedindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela ativação de SOCS3 e inibição de NF- $\kappa$ B (DE JONGE; ULLOA, 2007; TRACEY, 2007).

Recentemente, nosso grupo mostrou, utilizando animais com deficiência colinérgica, que a redução dos níveis de VAcHT induz a inflamação pulmonar com aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e redução da via JAK2/STAT3/SOCS3 (PINHEIRO et al., 2015). Ainda, ao submeter estes animais a um desafio inflamatório, como por exemplo, à poluição atmosférica, eles desenvolvem inflamação mais grave do que animais sem alteração colinérgica (SANTANA et al., 2019).

Embora classicamente saiba-se que a acetilcolina é um broncoconstritor, particularmente de receptores muscarínicos presentes nas vias aéreas, o efeito anti-inflamatório da acetilcolina via receptores nicotínicos tem sido aventado (FUJII; TAKADA-TAKATORI; KAWASHIMA, 2012). Malaspinas et al. (2018) demonstraram que a resistência das vias aéreas após desafio intravenoso com alérgeno em ratos sensibilizados, estava aumentada nos animais que receberam atropina, um antagonista competitivo das ações da acetilcolina, sugerindo que a acetilcolina possa desempenhar um papel anti-inflamatório.

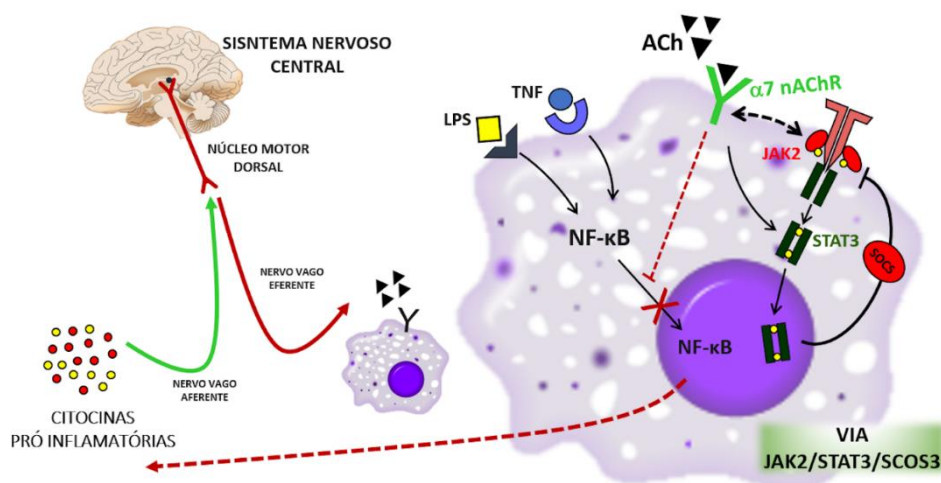


Figura 4. Esquema representativo do sistema colinérgico anti-inflamatório. A ACh, liberada frente a um estímulo via nervo vago, ligar-se em um receptor nicotínico alfa-7, inibindo a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo. Além disso, pode ativar a via JAK2/STAT3/SOCS3, impedindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela ativação de SOCS3 e pela inibição de NF- $\kappa$ B, tendo assim uma ação anti-inflamatória. Modificado de Tracey, 2007.

### 1.3 Modelos experimentais de asma

Diversos modelos experimentais que mimetizam a asma humana são descritos na literatura e são utilizados na tentativa de buscar novas alternativas terapêuticas para esta doença. Contudo, grande parte dos animais utilizados não desenvolve essa doença espontaneamente (ALLEN et al., 2009; HOLMES; SOLARI; HOLGATE, 2011). Alguns anos atrás, o modelo experimental mais utilizado era com cobaias (guinea pigs) que desenvolve asma apenas por sensibilizações inalatórias e apresenta grande hiperresponsividade brônquica (PRADO et al., 2006; TIBÉRIO et al., 1997). Este modelo apresentou inúmeras vantagens e trouxe grande contribuição com o melhor entendimento da fisiopatologia da asma, porém houve pouco avanço em relação ao desenvolvimento de anticorpos específicos ou modelo com modificação genética envolvendo estes animais.

Em modelos para camundongos, adotado no presente estudo, é realizado um estágio de sensibilização, geralmente por injeção intraperitoneal de ovoalbumina, uma proteína extraída da clara do ovo, associada a um adjuvante. O adjuvante mais utilizado para os modelos murino é o hidróxido de alumínio (Alumen), seguido de inalações sucessivas de ovoalbumina (SAKODA et al., 2016; TOLEDO et al., 2013).

O modelo utilizado por nosso grupo apresenta diversas características da asma, entre elas o aumento de eosinófilos, hiperreatividade brônquica, remodelamento brônquico e aumento da produção de muco (AUN et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; TOLEDO et al., 2013). Embora o camundongo não desenvolva exatamente asma brônquica, ele mimetiza muitas das características da asma humana, e tem a vantagem do baixo custo em relação a modelos com animais maiores, menor local

para manutenção, e uma disponibilidade de vasta gama de anticorpos para avaliação de mecanismos envolvidos.

#### 1.4 Compostos fitoquímicos

As plantas medicinais são utilizadas há décadas pela medicina popular como tratamentos alternativos para uma ampla gama de doenças, e que muitas vezes produzem alívio dos sintomas comparáveis ao obtido pelos medicamentos alopáticos. Além disso, diversos medicamentos foram desenvolvidos a partir de princípios ativos oriundos de plantas. Vários metabólitos derivados de plantas interferem diretamente com moléculas e mecanismos, tais como a mediação das respostas inflamatórias e produção/atividade de segundos mensageiros, bem como a expressão dos fatores de transcrição e principais moléculas pró-inflamatórias (CLARDY; WALSH, 2004). Embora o estudo de compostos derivados de plantas venha sendo desenvolvido em grande quantidade, muitos estudos não se preocupam em entender possíveis mecanismos de ação, o que é de fundamental importância para que estes compostos possam um dia ser utilizados na prática clínica.

##### 1.4.1 Sakuranetina

Flavonoides são derivados polifenólicos isolados de fontes naturais e são encontrados em uma ampla variedade de vegetais presentes na dieta humana (KIMATA et al., 2000). Estes compostos apresentam baixa toxicidade e são conhecidos por apresentarem propriedades antiproliferativas, antioxidantes,

anticarcinogênicas, antiteratogênicas, anti-inflamatórias e antialérgicas, além de efeitos sobre a função imunológica e células inflamatórias (HAVSTEEN, 2002).

Diversos estudos demonstraram que os flavonoides são capazes de inibir a degranulação de mastócitos com consequente redução da liberação de histamina, triptase, leucotrienos, prostaglandina D2, colônias de granulócitos, fator estimulador de macrófagos (GM-CSF), IL-4, IL-6 IL-8 e IL-13, assim como redução de macrófagos e redução da produção de muco (FUNAGUCHI et al., 2007; KIMATA et al., 2000; PODDER et al., 2014; SHICHIJO et al., 2003).

Dentre as diversas espécies vegetais usadas na medicina popular no Brasil estão àquelas pertencentes ao gênero *Baccharis*, uma espécie de arbusto com ampla dispersão em várias regiões do país (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Essas espécies são comumente consumidas na forma de chás, utilizadas para controle ou tratamento de várias doenças, como males do estômago, fígado, anemias, diabetes, doenças na próstata e principalmente para tratamento de processos inflamatórios (CORRÊA, 1984; FRANCO, 1995; KORBES, 1995). Mais de 500 espécies de *Baccharis* são descritas, dentre as quais a *B. retusa* se mostrou constituída majoritariamente por um derivado flavonoídico, a 5,4'-diidroxi-7-metoxi-flavanona (sakuranetina), cuja estrutura está apresentada na Figura 5.

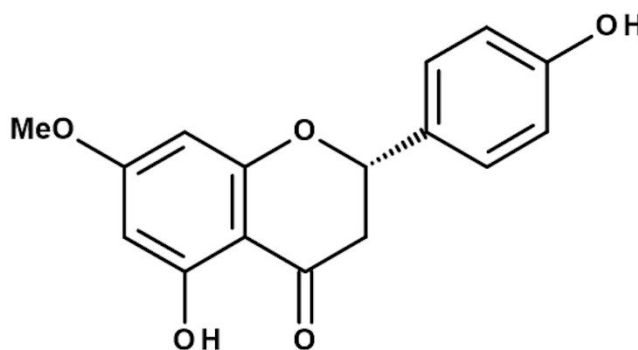


Figura 5. Estrutura química do flavonoide 5,4'-diidroxi-7-metoxi-flavanona, conhecido como sakuranetina.

Alguns trabalhos prévios descreveram que flavonoides exercem efeitos antialérgicos em modelos murino de asma (FUNAGUCHI et al., 2007; ROGERIO et al., 2007; SHI et al., 2014). Um flavonoide semelhante à sakuranetina, a naringenina, atenua a inflamação das vias aéreas em modelo murino de asma aguda, além de apresentar uma redução significativa nos níveis de IgE total e de citocinas (Th2) (SHI et al., 2014). No entanto, a composição farmacológica destes compostos difere de um tipo para outro.

Nosso grupo vem trabalhando com a sakuranetina, que foi efetiva na redução de anticorpos específicos ao antígeno e na inflamação pulmonar. Toledo et al., (2013) demonstraram que o tratamento com a sakuranetina, em modelo de asma experimental, induz uma redução das citocinas Th2 como IL-5 e RANTES além da redução da Eotaxina, uma quimiocina comumente elevada na asma, e uma redução da expressão de NF- $\kappa$ B. Houve menor número de células inflamatórias no pulmão, particularmente eosinófilos, e redução da quantidade de IgE produzida nos animais sensibilizados com ovoalbumina e tratados com esse flavonoide. Também foi demonstrado que o tratamento com a sakuranetina atenuou o remodelamento pulmonar com redução da porcentagem de fibras colágenas e elásticas comparado ao grupo sensibilizado e não tratado. Por fim, ainda foi demonstrado que houve redução do estresse oxidativo no pulmão de animais tratados.

A fim de observar se este tratamento também afetaria outros compartimentos pulmonares, também foi avaliado o efeito da sakuranetina nos vasos peribrônquicos (SAKODA et al., 2016). Observamos que este tratamento reduz o remodelamento de vasos e do parênquima pulmonar, e também a inflamação eosinofílica nestes locais. Embora tenhamos demonstrado um importante efeito da sakuranetina na asma

brônquica, as vias de sinalização e os exatos mecanismos pelos quais este composto atua em modelo de asma ainda não foram elucidados (LAGO et al., 2014).

#### 1.4.2 Eugenol e bis-eugenol

Os óleos essenciais são compostos provenientes de plantas que apresentam características lipofílicas, voláteis, odoríferas e líquidas. Os óleos essenciais são encontrados em flores, folhas, galhos, cascas, frutos, raízes e sementes e são substâncias que possuem em sua composição diferentes grupos químicos desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros (SIMÕES et al., 2010).

O eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) (Figura 6 A) é um óleo essencial, isolado pela primeira vez em 1929, utilizado em grande escala pela indústria alimentícia para síntese de vanilina sendo encontrados em diversas plantas, tendo um cheiro característico e forte de cravo (AZAMBUJA, 2017). Atualmente, este composto tem grande importância para a indústria farmacêutica, cosmética, de perfumaria, odontológica e de cigarros.

O eugenol também é conhecido pela sua ação anti-inflamatória, para alívio da dor, e inibe a peroxidação de lipídios (MAGALHÃES et al., 2010; MURAKAMI et al., 2003). Por outro lado, alguns trabalhos relatam que, a inalação constante de produtos à base de eugenol pode estar associado à crise alérgica, aumentando o número de células totais, eosinófilos e linfócitos do lavado broncoalveolar (LÓPEZ-SÁEZ et al., 2015; QUIRCE et al., 2007).

Entretanto, foi demonstrado que o eugenol tem ação inibitória na resposta inflamatória quando administrado via oral em modelo de asma experimental,



reduzindo os números de eosinófilos e nos níveis da citocina IL-5 (PAN; DONG, 2015). Outros estudos demonstraram, em diferentes modelos experimentais, um efeito desta substância na redução de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$  em processos inflamatórios dentários, redução do remodelamento das fibras de colágeno e de células inflamatórias em modelo de inflamação pulmonar aguda (HUANG et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2010; MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2016).

Uma molécula ortho dímero do eugenol, o bis-eugenol (ou deidrodieugenol) (Figura 6 B), encontrada em baixas concentrações em diversas espécies de plantas e também em outros produtos naturais tem se destacado por sua baixa citotoxicidade quando comparado ao eugenol, além de ter efeito anti-inflamatório e antiparasitário (ATSUMI et al., 2000; GRECCO et al., 2017; MURAKAMI et al., 2003).

A ação do bis-eugenol no modelo de asma ainda não é conhecida, e por ser menos tóxico poderia ter uma ação anti-inflamatória melhor em comparação com o eugenol. Em um estudo de macrófagos (RAW 264,7) expostos a LPS, o bis-eugenol inibiu atividade transcricional do NF- $\kappa$ B além de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias, tendo um efeito mais eficaz que o eugenol (MURAKAMI et al., 2003) e reforçando nossa hipótese. Desta forma, escolhemos entender melhor a ação destes dois compostos e avaliar se a dimerização da molécula poderia induzir melhores efeitos em relação ao eugenol.

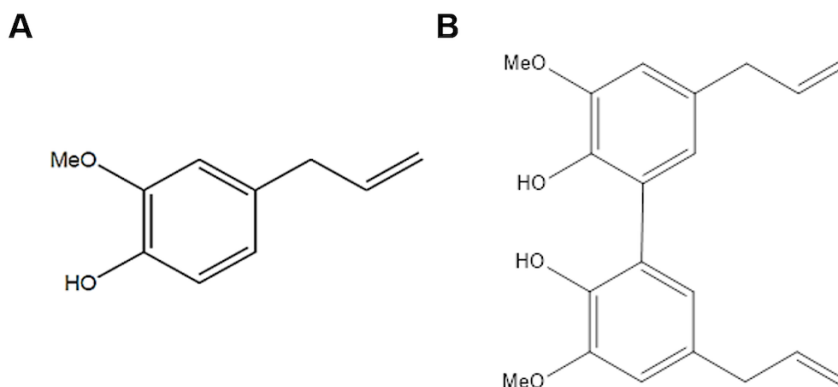


Figura 6. Representação molecular dos compostos (A) eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) e seu dímero (B) bis-eugenol.

### 1.5 Justificativa e Hipótese:

Embora diversos compostos derivados de plantas tenham sido testados no que se refere potencial anti-inflamatório em diversos modelos de doenças, nem todos os autores focam em elucidar mecanismos envolvidos. Neste sentido, alguns trabalhos têm mostrado em outras doenças que a via STAT3, pode ser um dos mecanismos intracelular que alguns compostos fitoquímicos atuam (DE JONGE; ULLOA, 2007; LI et al., 2017; SHI et al., 2017).

Ainda, já foi mostrado que os flavonoides e outros fitoquímicos atuam na redução da inflamação por inibição da via MAPK e NF- $\kappa$ B (XU et al., 2008; YANG et al., 2011) e parte desta hipótese foi confirmada por nosso grupo (TOLEDO et al., 2013). Considerando que a via colinérgica anti-inflamatória reduz a inflamação por inibição da translocação nuclear de NF- $\kappa$ B e ativação da via JAK/STAT/SOCS (DE JONGE; ULLOA, 2007) e que alguns trabalhos de revisão sugerem que fitoquímicos podem atuar via ativação de receptores nicotínicos envolvidas na via colinérgica anti-inflamatória, nossa hipótese é que a sakuranetina e o eugenol/bis-eugenol tenham

efeito anti-inflamatório por modulação da via colinérgica anti-inflamatória, JAK2/STAT3/SOCS3, MAPK, e/ou IL-17 reduzindo a inflamação.

A fim de elucidar efeitos *in vitro* diretos no controle da resposta inflamatória, e também para avaliar possíveis efeitos tóxicos, utilizou-se células RAW 264,7 que são derivadas de macrófagos alveolares e são bastante utilizadas para estudos de compostos simulando efeitos pulmonares.

Considerando que a asma humana é um problema de saúde pública, e que o padrão ouro de tratamento recomendado para pacientes asmáticos não reverte totalmente o processo de remodelamento pulmonar e muitas vezes não é eficaz em paciente com asma grave, é importante que novos estudos visem buscar novos alvos terapêuticos. Visto que os fitoquímicos testados tem grande potencial anti-inflamatório em diversos modelos de inflamação pulmonar (BITTENCOURT-MERNAK et al., 2017; TAGUCHI et al., 2015) e baixa toxicidade, a elucidação de seu papel na inflamação pulmonar é de grande relevância. E é de grande importância estudar os mecanismos envolvidos na atuação destes compostos como anti-inflamatório em modelo experimental de alergia crônica.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O presente projeto foi dividido em dois subprojetos cujo objetivos foram:

Objetivo Geral 1: Avaliar mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de *Baccharis retusa* (Asteraceae), em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas

Objetivo Geral 2: Avaliar as ações anti-inflamatórias e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas.

### 2.2 Objetivos específicos

#### 2.2.1 Subprojeto 1

- Avaliar a inflamação pulmonar, produção de muco e citocinas;
- Avaliar a expressão das vias MAPK, JAK2/STAT3/SOCS3 e sistema colinérgico anti-inflamatório no pulmão;
- Avaliar se a sakuranetina apresenta toxicidade *in vivo* e *in vitro*.

#### 2.2.2 Subprojeto 2

- Avaliar se eugenol e bis-eugenol apresenta toxicidade *in vitro*;
- Avaliar a função pulmonar;
- Avaliar a inflamação pulmonar e citocinas;
- Avaliar a expressão das vias MAPK, JAK2/STAT3/SOCS3 e sistema colinérgico anti-inflamatório;

### 3 Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado e desenvolvido de acordo com a Lei 11.794/08 (Lei Arouca) e com as normas pré-estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob os protocolos de números 105/15 e 047/17 e pela Comissão de Ética de uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob os protocolos de números 8319281014 e 1176290317, (Anexos 1-4). O desenvolvimento deste estudo foi realizado no Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20-FMUSP) e no Laboratório de Estudo de Inflamação Pulmonar no Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, na UNIFESP/Campus Diadema, atualmente alocado no Instituto de Saúde e Sociedade, no Campus Baixada Santista.

#### 3.1 Coleta, isolamento e caracterização dos compostos extraídos de plantas

O material vegetal isolado de cada composto estudado foi caracterizado e fornecido pelo laboratório de Química Bioorgânica (LABIORG) da Universidade Federal d ABC (UFABC) do Prof. Dr. João Henrique G. Lago.

##### 3.1.1 Sakuranetina

As folhas e galhos finos (partes aéreas) da planta *Baccharis retusa* DC (Asteraceae) foram coletados na cidade de Campos do Jordão/SP, sendo que uma exsicata do espécime estudado foi depositada no herbário do Instituto Florestal de São Paulo.

As folhas de *B. retusa* foram mantidas em estufa a 40 °C até secagem total e reduzidas em pó. Em seguida, os extratos brutos foram preparados, submetendo o material vegetal previamente obtido na extração exaustiva em hexano (para retirada do material graxo) e posteriormente em etanol. O extrato etanólico, após adição de água destilada, foi inicialmente submetido a um processo de partição solvente-solvente com hexano. A fase orgânica foi submetida a fracionamento cromatográfico em gel de sílica normal utilizando-se misturas de solventes em polaridade crescente (hexano – acetato de etila – metanol). Em seguida, foram utilizados métodos usuais de separação em gel de sílica de fase normal, em fase reversa, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência, visando o isolamento do flavonoide sakuranetina. Após o isolamento, o composto teve sua estrutura confirmada pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massas e espectroscopia na região do infravermelho seguido de comparação com dados descritos na literatura (GRECCO et al., 2012) .

### 3.1.2 Eugenol e bis-eugenol

As folhas de *Nectandra leucantha* (Lauraceae) foram coletadas em região de Mata Atlântica ocorrente no Parque Ecológico do Perequê, Cubatão/SP. Após coleta, as folhas foram mantidas em local arejado até secagem total e foi realizada a moagem. O material vegetal em pó foi extraído até esgotamento com hexano. O extrato bruto, após evaporação do solvente, foi submetido a fracionamento em gel de sílica, utilizando-se misturas de hexano e acetonitrila em gradiente de polaridade até o isolamento do eugenol e do seu dímero, bis-eugenol (ou deidrodieugenol). Para a separação do composto utilizou-se a cromatografia em coluna SPCCC (Spiral Coil Column Chromatography). A partir dos resultados, deu-se origem a 17 frações e

utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada e espectrometria para a identificação da fração enriquecida em dímeros de eugenol. As espectrometrias utilizadas foram ressonância magnética nuclear (RMN), a de infravermelho (IV) e a de massas (EM).

### 3.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados camundongos Balb/C machos, com peso médio de 20 g e idade aproximada de 6-8 semanas adquiridos do Biotério Central da FMUSP. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Terapêutica Experimental – LIM20 em ciclos de 12 horas de luz/escuro, salas com temperatura controlada de 21 à 23°C e livre acesso a água e comida.

Este trabalho foi dividido em dois subprojetos (1 e 2), sendo um deles para estudar o tratamento com o flavonoide sakuranetina, contendo 4 grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais do subprojeto 1.

GRUPOS	Ovoalbumina	Sakuranetina	Dexametasona	Salina
SAL				X
OVA	X			X
SK	X	X		
DX	X		X	

O segundo subprojeto que teve como objetivo estudar os compostos eugenol e seu dímero bis-eugenol, em um primeiro momento, camundongos Balb/C foram

divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais para definimos a dose utilizada do tratamento, utilizando as doses de tratamento de 5, 10 e 20 mg/kg, conforme tabela abaixo (Tabela 2). Após a escolha da melhor dose, deu-se continuidade com os grupos experimentais da Tabela 3

Tabela 2 Grupos experimentais do subprojeto 2 – Curva dose resposta ao tratamento com eugenol. Doses de 5, 10 e 20 mg/kg.

GRUPOS	Ovoalbumina	Salina	Eugenol	Veículo
SAL		X		X
OVA	X			X
EUG5	X		X	
EUG10	X		X	
EUG20	X		X	

Tabela 3 Grupos experimentais do subprojeto 2 – Tratamentos com eugenol e bis-eugenol.

GRUPOS	Ovoalbumina	Salina	Tratamento	Veículo
SAL		X		X
OVA	X			X
EUG	X		X	
BIS	X		X	
DX	X		X	



### 3.2.1 Modelo de inflamação alérgica crônica de vias aéreas

Os diferentes grupos experimentais foram submetidos ao protocolo de sensibilização e indução da inflamação alérgica pulmonar (Figura 7). Nos dias 0 e 14 do protocolo, foi aplicada uma injeção intraperitoneal (i. p.) de 50 µg de ovoalbumina (grade IV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e hidróxido de alumínio (Pepsamar, Sandei-Synthelabo SA, RJ, Brasil) diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, os animais foram submetidos ao desafio inalatório, nos dias 22, 24, 26 e 28. Para tanto, foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, SP, BR) e submetidos à inalação de aerossol de ovoalbumina (OVA) diluída em NaCl 0,9% na concentração de 10 mg/mL (1%) por 30 minutos. Animais do grupo controle negativo (SAL) seguiram com os mesmos critérios do protocolo, porém receberam solução salina ao invés de ovoalbumina (TOLEDO et al., 2013) (Figura 7).

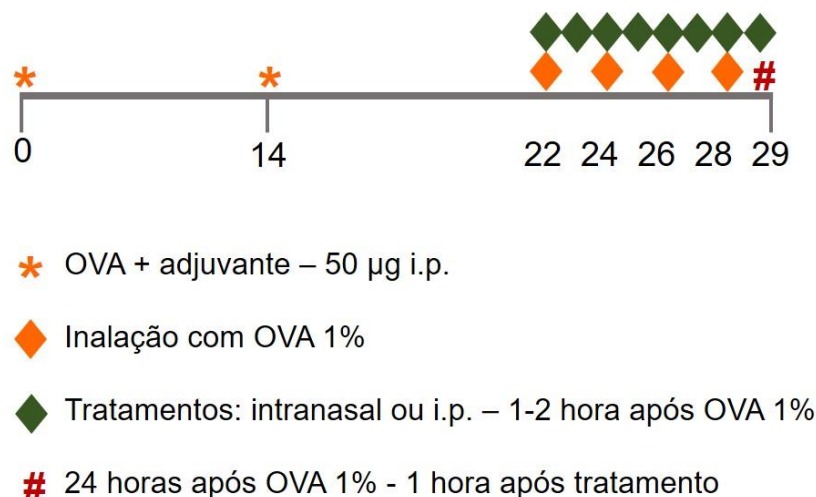


Figura 7. Protocolo esquematizado da sensibilização com ovoalbumina (OVA) e tratamentos. Os grupos receberam injeção intraperitoneal de solução de OVA (concentração 50 µg/mL) e Hidróxido de alumínio nos dias 0 e 14. Nos dias 22, 24, 26 e 28 os grupos receberam inalação de solução de 1% de OVA por 30 minutos. Os tratamentos com sakuranetina (20 mg/kg, via intranasal), eugenol e bis-eugenol (10 mg/kg, via i.p.) e dexametasona (5 mg/kg, via i.p.) foram administrados nos dias 22 ao 29 deste protocolo.

### 3.2.2 Tratamento com sakuranetina, eugenol e bis-eugenol

O tratamento com sakuranetina foi realizado conforme descrito por Toledo et. al., (2013). Para isso, foi realizado instilação intranasal de 10 µL de sakuranetina na dose de 20 mg/kg diluída em veículo (80% DMSO + 20% solução salina). Como controle positivo, foi utilizado a dexametasona, utilizando o medicamento DECADRON- 2 mg/mL (ACHE, Guarulhos, SP, Brasil), na dose de 5 mg / kg, por via intraperitoneal (i.p.). Ambos os tratamentos foram administrados a partir do dia 22 ao 29 do protocolo experimental, uma vez por dia, 2 horas depois dos animais serem expostos a inalação de ovoalbumina ou solução salina (Figura 7).

No subprojeto 2, como citado acima foi realizado uma curva dose-resposta de eugenol, nas doses de 5 mg/kg (EUG5), 10 mg/kg (EUG10) e 20 mg/kg (EUG20). Todas as doses foram diluídas em veículo (1:1 de DMSO e solução salina) e foram administradas por injeção via i.p. de 100 µl do dia 22 ao 29 do protocolo experimental, uma vez por dia, 1 hora depois dos animais serem expostos a inalação de ovoalbumina (Figura 7). Nos grupos que não receberam tratamento, foi administrado veículo (50 % DMSO e 50 % solução salina) em protocolo semelhante.

Após ter escolhido a dose de melhor efeito, foram realizados os grupos experimentais descritos na Tabela 3. O tratamento com bis-eugenol foi realizado da mesma forma do eugenol, e o tratamento com dexametasona foi utilizado da mesma forma descrita acima no subprojeto 1.

### 3.3 Contagem de leucócitos no sangue

Vinte e quatro horas após a última inalação de ovoalbumina 1% ou salina e 30 minutos após tratamento, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália) (70 mg/Kg). Foi coletado 10 µL de sangue periférico por um corte na cauda do camundongo. O sangue coletado foi diluído em uma solução de líquido de Turk 1% (1:20) para a contagem total de leucócitos, utilizando microscopia óptica e um hemocitômetro de Neubauer no aumento de 400X. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foi efetuado o esfregaço sanguíneo e corado com kit de coloração rápida para hematologia (Instant-Prov, New-Prov, Pinhais, PR, Brasil). A contagem diferencial foi determinada a partir do achado de 100 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos, com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X) (SANTANA et al., 2019).

### 3.4 Mecânica respiratória

Sob efeito anestésico, foi realizada a traqueostomia com a introdução de uma cânula de aço de calibre 40x0,12mm (BD Plastipak, Franklin Lakes, NJ, EUA) na traqueia na qual a mesma foi conectada a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá), com volume corrente de 10 mL/kg e a frequência respiratória de 150 ipm. Após, foi realizada a utilização de um vaporizador para curva dose-resposta com infusão de metacolina inalatória nas doses de 3, 30,

300, 3000 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Os dados de mecânica respiratória foram coletados no momento zero (basal) onde foi administrado salina e foi coletados os valores após 30 segundos e 1 a 3 minutos de cada dose, tendo um intervalo de 2 minutos entre as infusões de metacolina.

Prontamente após a conexão dos animais traqueostomizados ao ventilador, foi calculada a impedância do sistema respiratório ( $Z_{rs}$ ) dos animais de cada grupo utilizado um volume de perturbação de 16 segundos. Os dados foram coletados após 2 minutos da administração de 0,02 ml de pancurônio intramuscular, descartando a possibilidade de haver interferência do animal.

Para o cálculo da elastância do sistema respiratório ( $E_{rs}$ ) e da resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ) foi utilizada a equação do movimento do sistema respiratório:  $P_{tr}(t) = E_{rs} \cdot V(t) + R_{rs} \cdot V'(t)$ , onde:  $P_{tr}$  é a pressão traqueal,  $V$  é o volume,  $V'$  é o fluxo e  $t$  corresponde ao tempo.

Para o cálculo dos dados de oscilação forçada foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (BATES; DARÓCZY; HANTOS, 1992).  $V_{cyl}$  foi corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegou ao animal ( $V$ ) e  $P_{cyl}$  foi corrigido, nos dando o valor de  $P_{aw}$ , pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de  $V$ , obteremos o fluxo ( $V'$ ). Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos (HANTOS et al., 1992).

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Onde  $R_{aw}$  é a resistência de vias aéreas,  $I_{aw}$  é a inertância,  $G$  caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares,  $H$  caracteriza a energia acumulada no tecido do pulmão,  $i$  é a unidade imaginária,  $f$  é a frequência e  $\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$ .

A avaliação da mecânica respiratória foi realizada apenas nos grupos do subprojeto 2, uma vez que a avaliação da função nos animais do subprojeto 1 já havia sido demonstrada anteriormente por nosso grupo (TOLEDO et al., 2013). Os resultados foram apresentados na resposta da dose de 300 µg/mL de metacolina no tempo de 2 minutos para cada variável.

### 3.5 Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)

Ainda sob efeito da anestesia, foi realizado laparotomia para eutanásia por exsanguinação via secção da veia cava inferior. Utilizando uma seringa contendo 1,5 mL de salina, foram realizadas infusões de 0,5 mL (salina) 3 vezes consecutivas pela cânula inserida na traqueia. O volume recuperado (aproximadamente 80% do volume injetado) foi centrifugado a 1000 rpm, 4°C, por 20 minutos. O botão celular foi ressuspendido em 300 µL de solução salina.

A contagem total de células foi realizada por microscopia óptica com auxílio de um hemocítômetro de Neubauer no aumento de 400X. Para tanto, 90 µL do lavado foram diluídos em 10 µL de solução de cristal de violeta para leitura. Para a contagem diferencial das células, 100 µL do LBA foram citocentrifugados à 450 rpm por 6 minutos em uma citocentrífuga (Cytospin 2, Shandon Instruments, PA) em duplicata. Após secas, as lâminas foram coradas com kit de coloração rápida para hematologia (Instant-Prov). A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de no mínimo 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (100X).

### 3.6 Lavado da Medula Óssea

Após a eutanásia dos animais, o fêmur esquerdo foi cirurgicamente removido e ambas as extremidades foram abertas para permitir a perfusão no canal medular de 1 ml de PBS injetado com auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa plástica. A suspensão de células do lavado medular foi diluída 1:20 em PBS e foi acrescentado 10 µL de cristal de violeta (0,2%) para quantificação a partir da leitura pela câmara de Neubauer.

### 3.7 Coleta do pulmão, fígado, baço e timo

Imediatamente após a coleta do LBA, a caixa torácica anterior foi aberta e o pulmão retirado em monobloco coração-pulmão. Também foram retirados o fígado, baço e timo para pesagem e armazenamento para futuros estudos, e avaliação de alterações morfológicas no fígado. A massa do fígado e a análise histopatológica foram associadas e utilizadas como marcador indireto de um possível efeito tóxico das drogas utilizadas.

No subprojeto 1, o pulmão esquerdo foi isolado e imediatamente congelado em nitrogênio e armazenado em freezer -80°C para as análises de citocinas e proteínas. O pulmão direito foi fixado em solução de formaldeído de 10% por 24 horas e após esse período foram transferidos para uma solução de etanol 70% e em seguida, foram cortados no seu maior eixo e colocados em cassetes histológicos. As amostras foram colocadas no processador de tecido (TP1020, Leica, Wetzlar, GER) onde foram clareadas e desidratadas e parafinizadas. Logo após, foi realizada a inclusão de parafina nesses tecidos (Inclusor de parafina - EG1150 e Placa de Gelo - EG1150H,

Leica), obtendo blocos do tecido em parafina. Foi realizado o corte histológico de 3 µm de espessura no micrótomo (RM-2245, Leica). As lâminas de fígado foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E), e as lâminas de pulmão à coloração de Ácido Periódico Schiff com Azul Alciano (PAS/AB)

### 3.7.1 Coloração de PAS/AB

As lâminas com corte de pulmão com 3 µm foram sujeitas a desparafinização e hidratação (Xilol 1,2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70%). Em seguida, os cortes foram submersos em uma solução de Ácido Acético Glacial 3% por 3 minutos e em uma solução de Alcian Blue por 1 hora. Após lavar em água corrente por 5 minutos e em água destilada, as lâminas foram submersas em Reagente de Schiff por 10 minutos, depois em uma solução de Hipossulfito de sódio 1% por 5 minutos e por fim foram submetidas a coloração com Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos. Após coloração, as lâminas foram desidratadas e montadas.

A coloração de PAS/AB foi utilizada para a avaliação do muco presente no epitélio das vias aéreas e epitélio nasal no subprojeto 1. Essa coloração cora as substâncias ácidas do muco em azul e as neutras em rosa.

### 3.8 Dosagem de IgE, IgG1 e IgG2a OVA-específica

A dosagem dos anticorpos antígeno-específicos IgE, IgG1 e IgG2 foi realizada pelo método indireto de ELISA. Placas de 96 poços de alta sensibilidade (Corning Inc., Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas pelo antígeno Ovalbumina (10 µg/mL), e bloqueada para ligações inespecíficas com uma solução de albumina de soro bovino

10% (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA). Em seguida, amostras de plasma retirados dos animais foram adicionadas em diluições previamente determinadas (1:40 em PBS) e incubada durante a noite por 4 °C. Então, foi adicionado anticorpo de detecção específico para IgE, IgG1 e IgG2a (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). A revelação foi realizada com uma solução de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), sendo essa reação interrompida pelo de solução ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4N). Para a quantificação dos níveis do anticorpo, foi utilizado o espectrofotômetro de placa (Spectramax L, Molecular Devices, EUA) com leitura em densidade óptica a 490 nm.

### 3.9 Quantificação das proteínas no pulmão

Para a quantificação das proteínas totais, foi utilizado aproximadamente 100 mg de pulmão, individualmente homogeneizados com um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, modelo PT 10/35) em 1 mL de tampão de extração de proteína [2 mM Trisma pH 7,5; 150 mM de NaCl; 2% de NP40; 0,2% de SDS, 1 mM EDTA pH 8,00; 10% de Glicerol; 20 mM de Fluoreto de sódio; 30 mM de Pirosofato de sódio tetra hidratado; 0,5% de Deoxicolato de sódio; 1mM de Ortovanadato de sódio; 5 µM Aprotinina, 1 mM de Parametil Sulfonilfluoreto (PMSF) e água destilada]. Depois de homogeneizado, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 12.000 g/ 4 °C por 15 min para a remoção do material insolúvel (pellet).

Após a centrifugação, parte do sobrenadante foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente BradFord (Protein Assay, BioRad, Hercules, CA, EUA) na titulação de 1:5. As amostras de pulmão foram diluídas 1:10 em água destilada, e 6 µl de cada amostra foi pipetado em placas de 96 poços com 300 µl de Bradford. Para quantificação das proteínas, foi utilizada uma



curva padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg / mL. Após a pipetagem, as placas foram mantidas no escuro por 10 minutos e a leitura foi realizada por espectrofotômetro (Epoch - BioTek, Winooski, VT, EUA) pelo programa GEN 5.1.1.1 com leitura em densidade óptica a 595 nm.

Utilizando o software GraphPad InStat (versão 3.0, EUA), os valores obtidos em absorbância e corrigidos pelo seu branco (BradFord), por meio da equação da reta obtida pela curva estabelecida de BSA foram transformados e expressados em mg/mL.

### 3.10 Dosagem de citocinas no pulmão (ELISA)

Para a detecção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) em homogenato de pulmão, de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, placas de 96 poços com alta sensibilidade foram sensibilizadas com cada anticorpo específico para citocina de interesse. Após esta sensibilização, as placas foram lavadas e bloqueadas para ligações inespecíficas. As amostras foram distribuídas e incubadas para que em seguida fossem adicionados anticorpos conjugados à biotina específicos para a diferenciação. A revelação foi realizada com conjugado enzimático de estreptavidina-peroxidase, substrato e cromógeno (R&D Systems), cuja reação foi interrompida a adição de uma solução ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2N). Para a quantificação das citocinas, foi utilizado o espectrofotômetro de placa (Epoch – Biotek) e o programa GEN 5.1.1.1 com leitura em densidade óptica a 450 nm. A

correção foi realizada pela proteína total quantificada e os valores foram expressos por pg/mg de proteína.

### 3.11 Expressão das vias de sinalização no pulmão

A técnica de Western Blotting foi utilizada para identificar as proteínas JAK2, STAT3, SOCS3, p38, ERK1/2 (p-p44/p42), JNK e VACHT (Transportador vesicular de acetilcolina) (Sistema colinérgico anti-inflamatório). As especificações dos anticorpos utilizados se encontram descrita na Tabela 4. Todas as análises foram corrigidas com a proteína constitutiva  $\beta$ -actina para normalização e comparação dos resultados, exceto anticorpos fosforilados que foram corrigidos pela proteína total perspectiva.

Foi adicionado no homogenato do pulmão o tampão de Laemmli contendo DTT (Dithiothreitol, Bio-Rad) 200 mM e as amostras foram aquecidas em banho seco a 96°C por 5 minutos. Estas amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean, Bio-Rad). Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos (Precision Plus Protein Standards – Dual Color, Bio-Rad).

Tabela 4: Especificações dos anticorpos utilizados para a realização do Western Blotting.

Anticorpo	Diluição	Secundário	kDa	Marca	Código
JAK2 (D2E12)	1:1000	Rabbit	125	Cell Signalling	#3230
p-STAT3 (Tyr705)	1:1000	Rabbit	76,86	Cell Signalling	#9131
STAT3 (124H6)	1:1000	Mouse	76,86	Cell Signalling	#9139
SOCS3	1:1000	Rabbit	26	Cell Signalling	#2923
p-p38 MAPK (Thr 130/Tyrn182) (28B10)	1:1000	Mouse	43	Cell Signalling	#9216
p38 MAPK (D13E1)	1:1000	Rabbit	40	Cell Signalling	#8630
p-p44/p42 MAPK (Thr 202/Tyr204) (D13.14.4E)	1:2000	Rabbit	44,42	Cell Signalling	#4370
p44/p42 MAP-kinase (L34F12)	1:2000	Mouse	44,42	Cell Signalling	#4696
p-JNK	1:2000	Mouse	46, 54	Cell Signalling	#9255
SAPK/JNK	1:1000	Rabbit	46,54	Cell Signalling	#9252
VACHT (S6-38)	1:1000	Mouse	56	Abcam	Ab134298
$\beta$ -actina	1:5000	Mouse	42	Sigma-Aldrich	A5316

A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de transferência semi-seca (BioRad) por 90 minutos a 15 volts. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação desta com uma solução bloqueadora (leite desnatado 2,5-5% ou BSA 5% por 20-120 minutos). As membranas foram lavadas 3x com TBS-T por 5 minutos cada e então incubadas com anticorpo primário diluído em PBS-T ou TBS-T com 3-5% de BSA. As membranas foram mantidas submersas no anticorpo primário overnight à 4°C. Logo após, foram novamente lavadas com TBS-T 3x/15 min e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (conforme Tabela 2). Para a revelação, as membranas foram incubadas por 1 minuto em uma solução contendo: luminol (2,5 mM), ácido p-cumárico (450  $\mu$ M); Tris pH 8,5 (100  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5,4 mM), podendo assim ser detectado em um fotodocumentador (Uvited Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) por

quimiluminescência. Para quantificação da mesma proteína fosforilada e total, foi realizado um *stripping* nas membranas, para a retirada das ligações do anticorpo anterior. A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa Uviband (Uvitec) e expressas em porcentagem corrigida pelo grupo controle.

### 3.12 Atividade antioxidante por DPPH

A atividade sequestradora de radicais livres foi medida usando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 250 µL de solução de DPPH (1 mM) foi misturada com 40 µL de diferentes concentrações da amostra (1 – 500 µg/mL). 30 minutos mais tarde, a absorbância foi medida a 517 nm. O Ácido Gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como o composto de referência. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula: [DPPH] (%) =  $(Ac - As) / Ac \times 100$ , onde: Ac = controle de absorção; As = Absorbância da Amostra.

### 3.13 Cultura de Celular de RAW 264,7

Foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264,7 de camundongos previamente obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, USA) para análises de toxicidade *in vitro* em colaboração com o Prof. Dr. Lídio Neto do Centro Universitário do Maranhão (CEUMA). As células foram cultivadas em garrafas apropriadas e estéreis com meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich) suplementados com 1% de solução antibiótico + antifúngico (Sigma-Aldrich) e Soro Fetal Bovino (SFB, Sigma-Aldrich) com proporção de acordo com a necessidade celular (variando de 2 a 10%) e incubadas a 37°C em atmosfera

umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. A contagem global de células foi efetuada em câmara de Neubauer, partindo-se da suspensão de 1 mL diluída 10x em solução de Azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular e para a contagem total do número de macrófagos.

### 3.13.1 Ensaio de Citotoxicidade por MTT -Viabilidade Celular

Foi avaliada a viabilidade celular utilizando os compostos sakuranetina, eugenol e bis-eugenol nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 µg/mL. Para o ensaio de viabilidade celular por MTT as células foram tratadas apenas com os compostos em estudo nas suas concentrações desejadas.

Em uma placa de 96 poços foram adicionadas cerca de  $2 \times 10^5$  células em 200 µL de meio RPMI + SFB 2% por poço e incubadas por 24 h para aderência. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado, em triplicata, 200 µL das drogas nas concentrações estudadas e diluídas no meio RPMI+SFB 2% e incubadas por 48 horas. O sobrenadante foi descartado novamente e acrescido de 100 µL do mesmo meio com MTT – [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich] (0,5%) para a formação de cristais de formazan nas células viáveis. A placa foi incubada por quatro horas e depois desse período o meio foi trocado por 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) e mantido em temperatura ambiente para a lise celular e solubilização completa do precipitado formado pelos cristais de formazan. A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda a 570 nm. A partir das leituras obtidas foram calculadas as porcentagens de crescimento e viabilidade celular pela fórmula: %Viabilidade =  $TA/T1 \times 100$ , onde: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra; e T1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento.

### 3.13.2 Dosagem de Óxido Nítrico

Para o ensaio de dosagem de óxido nítrico (NO), as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) (30.000UE/10µg/100µL/poço) obtido de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich). Em uma placa de 96 poços, as células RAW 264,7 foram divididas em grupos: a) Controle negativo (somente meio de cultura); b) Controle positivo - LPS (células estimuladas com LPS); c) Tratamentos com sakuranetina nas doses 5, 10, 20 e 50 µg/mL (células estimuladas com LPS e tratadas com sakuranetina nas diferentes doses); d) Tratamentos com eugenol nas doses 5, 10, 20 e 50 µg/mL (células estimuladas com LPS e tratadas com eugenol nas diferentes doses) e e) Tratamentos com bis-eugenol nas doses 5, 10, 20 e 50 µg/mL (células estimuladas com LPS e tratadas com bis-eugenol nas diferentes doses).

A quantidade de nitrito presente no meio de cultura foi mensurada como um indicador da produção de NO por meio da Reação de Griess, adicionando 100 µL do sobrenadante do meio de cultura a igual volume do Reagente de Griess. Em seguida, foi efetuada a incubação à temperatura ambiente durante 10 minutos e posterior leitura em espectrofotômetro com absorbância de 540 nm. O meio de cultura fresco foi utilizado como branco em todos os experimentos. A quantidade de nitrito (NO<sub>2</sub>-) nas amostras foi obtida por meio de curva padrão de diluição seriada de NaNO<sub>2</sub>. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em µM.

### 3.13.3 Expressão gênica por qPCR

O RNA das amostras de células foi obtido utilizando o kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. A síntese de cDNA das amostras de RNA foi realizada com o kit comercial High Capacity

cDNA Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

Para avaliar o perfil inflamatório na expressão gênica da citocinas IL1- $\beta$  e IL-6, comumente aumentadas pela exposição do LPS em macrófagos da linhagem RAW 264,7, foi realizado uma reação de PCR em tempo real, onde foi utilizado o kit QuantiTest SYBER Green PCR (Qiagen, Alemanha), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. As reações foram realizadas utilizando um volume final de 20  $\mu$ L, contendo 10  $\mu$ L do Master mix (SYBER Green), 7,2  $\mu$ L de água RNase free, 0,4  $\mu$ L de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (forward e reverse) e 2  $\mu$ L da amostra de cDNA. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para os genes de interesse: IL-1 $\beta$  (primer forward: GGCAGCTACCTGTGTCTTCC/ primer reverse ATATGGGTCCGACAGCACGAG), IL-6 (primer forward: CAGGCTCCGAGATGAACAAC/ primer reverse GGTGGAGAGCTTTCAGCTCATAT) e GAPDH (primer forward: TGAAGGTCGGTGTGAACGG / primer reverse CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA) como controle endógeno.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em duplicata utilizando o aparelho Quantstudio 6. Como controle negativo da reação, foi utilizado poços contendo apenas o máster mix e os oligonucleotídeos iniciadores, com a ausência de amostras de cDNA. A análise das curvas de melting e de dissolução foi feita ao final de cada ensaio, como controle de qualidade da amplificação gênica. Para a análise da expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real, foi utilizado o método de Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### 3.14 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para a comparação entre os grupos, os dados com distribuição paramétrica foram submetidos à Análise de variância de um fator (One-Way ANOVA) seguida pelo teste de Holm-Sidak. Foram consideradas as diferenças entre os grupos como estatisticamente significantes quando o valor de  $p$  para o erro alfa for menor que 0,05. Os gráficos foram elaborados utilizando-se o mesmo software e estão em forma de barra com média e erro padrão da média (Média $\pm$ EPM).



## 4 Resultados

Os dados obtidos serão mostrados separadamente como subprojetos 1 e 2. O resumo dos resultados dos subprojetos 1 e 2 está representado em forma de tabela na discussão (Tabela 7 e Tabela 8), e o artigo referente ao subprojeto 1 está no anexo 5.

### 4.1 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de *Baccharis retusa* (Asteraceae), em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas

#### 4.1.1 A sakuranetina inibe a exacerbação da resposta alérgica e inflamatória em animais com asma experimental

Os dados de células do lavado da medula óssea, do sangue periférico, do lavado broncoalveolar e dos níveis de IgE, IgG1 e IgG2a, assim como a porcentagem da massa do timo e do baço, estão demonstrados na Tabela 5.

Não houve alterações quanto ao número de células encontrado na medula óssea nos grupos estudados. Quanto aos leucócitos totais no sangue periférico, não houve diferença entre os grupos, no entanto, o grupo de animais que foi sensibilizado com OVA apresentaram um aumento de eosinófilos quando comparado com o grupo controle SAL ( $p < 0,05$ ). Tanto o tratamento com a SK, quanto com a DX reduziu o número de eosinófilo quando comparado com o grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Também foi observado uma redução significativa no número de linfócito do grupo tratado com dexametasona quando comparado com o grupo sensibilizado OVA ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa quanto aos números de monócitos e neutrófilos presentes no sangue dos grupos estudados.

Foi analisado o infiltrado inflamatório presente nas vias aéreas pela contagem de células inflamatórias no LBA. O número de células inflamatórias foi maior no grupo OVA comparado com o grupo SAL ( $p < 0,001$ ). Os tratamentos com a SK e com a DX foram capazes de reduzir a presença dessas células inflamatórias ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5). Pode-se observar na diferenciação das células inflamatórias, um aumento de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos no grupo sensibilizado com OVA ( $p < 0,001$  para eosinófilos e macrófagos e  $p < 0,05$  para os demais) comparado com o grupo SAL. O tratamento com SK foi eficiente para reduzir os números de eosinófilos e macrófagos assim como o tratamento com DX ( $p < 0,001$  para ambos os tratamentos), entretanto, o tratamento com DX ainda reduziu os números de linfócitos presentes no LBA ( $p < 0,01$ ). Nenhum dos tratamentos foi eficiente para reduzir os números de neutrófilos presentes no LBA (Tabela 5).

Na dosagem de anticorpos específicos do antígeno ovoalbumina no plasma, o processo de sensibilização aumentou os níveis de IgE e IgG2a no grupos dos animais OVA quando comparado com o grupo controle SAL ( $p < 0,05$  para ambos) (Tabela 5). O grupo que recebeu o tratamento com a SK apresentou uma redução dos níveis de IgE ( $p < 0,05$ ) mas manteve os níveis elevados de IgG2a quando comparado como grupo OVA. O grupo tratado com DX não reduziu os níveis de IgE e não alterou IgG2a. Não houve diferença entre os grupos quanto ao nível de IgG1 no plasma.

Para avaliarmos indiretamente a resposta relacionada a imunidade nos grupos estudados, foi realizado a pesagem do timo e do baço corrigidos pela massa corpórea de cada animal. O grupo OVA apresentou aumento da porcentagem do peso do timo ( $p < 0,05$ ) e do baço ( $p < 0,05$ ) em relação ao peso dos animais quando comparado com o grupo SAL. Ambos os tratamentos reduziram a porcentagem da massa tanto do timo

(SK:  $p < 0,05$  e DX:  $p < 0,001$ ) quanto do baço (SK:  $p < 0,05$  e DX:  $p < 0,001$ ) comparados com o grupo OVA.

Tabela 5. Efeito do tratamento com a sakuranetina nos parâmetros inflamatórios e resposta imune. A exposição de OVA resultou no aumento de células inflamatórias no sangue (cels/mm<sup>3</sup>), como eosinófilos, e no lavado broncoalveolar (LBA, 10<sup>4</sup> cels/mL), como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos, IgE e IgG2a no plasma (OD) e aumento da massa de órgãos imune (%). O tratamento com a sakuranetina reduziu os eosinófilos no sangue, eosinófilos e macrófagos no LBA, IgE e IgG2a e a massa do timo e do baço. # $p < 0,05$  comparado com grupo SAL; \* $p < 0,001$  comparado com o grupo SAL; + $p < 0,05$  comparado com grupo OVA; \$ $p < 0,001$  comparado com grupo OVA; € $p < 0,001$  comparado com grupo SK. Dados apresentados com Média±EPM, n de 5 a 8 animais por grupo.

Dados/Grupos	SAL	OVA	SK	DX
<b>Medula Óssea x 10<sup>6</sup> cels/mL</b>				
Células totais	38,25±6,90	50,64±8,05	42,64±8,23	37,83±11,48
<b>Sangue x cels/mm<sup>3</sup></b>				
Leucócitos	5290,0±1327,0	8340,0±1658,0	7310,0±2083,0	4913,0±1339,0
Monócitos	305,20±70,10	837,90±415,60	377,40±211,30	245,80±185,40
Linfócitos	1752,0±397,30	2685,0±497,50	1339,0±303,30	+764,90±321,50
Neutrófilos	3055,0±947,30	2455,0±613,0	4665,0±1196,0	3852,0±842,90
Eosinófilos	177,90±53,55	#2382,0±706,0	+377,40±211,30	+123,60±51,07
<b>LBA x 10<sup>4</sup> cels/mL</b>				
Células totais	2,18±0,71	*18,72±7,30	#, \$7,30±1,35	\$3,75±0,76
Macrófagos	1,92±0,56	*9,44±0,93	\$3,38±0,78	\$2,55±0,43
Linfócitos	0,20±0,14	#1,19±0,25	0,74±0,41	+0,20±0,09
Neutrófilos	0,05±0,03	#0,95±0,29	0,75±0,23	0,61±0,10
Eosinófilos	0,01±0,004	*7,12±1,11	\$2,42±0,89	\$0,39±0,22
<b>Anticorpos OVA específicos (OD)</b>				
IgE	0,07±0,032	#1,23±0,329	+0,47±0,055	#1,28±0,45
IgG1	1,47±0,317	2,08±0,208	1,54±0,321	2,45±0,01
IgG2a	0,06±0,008	#2,21±0,405	#1,91±0,473	1,17±0,91
<b>Órgãos / Massa (g)/Camundongo (%)</b>				
Timo	0,18±0,01	#0,26±0,02	+0,15±0,02	\$0,11±0,01
Baço	0,45±0,04	#0,59±0,01	+0,49±0,03	*, \$, €0,24±0,01

#### 4.1.2 A sakuranetina reduz a área do epitélio brônquico e o muco ácido no epitélio nasal e brônquico em animais com asma experimental

Um dos fatores presentes em pacientes com asma é o aumento de muco nas vias respiratórias. Foi avaliado neste modelo a quantidade de muco ácido e neutro no epitélio brônquico e nasal, além da área do epitélio brônquico.

O grupo OVA apresentou um aumento na porcentagem da área do epitélio brônquico quando comparado com o grupo SAL ( $p < 0,001$ ) (Figura 8 A). Além disso, o grupo OVA apresentou um aumento de muco ácido tanto no epitélio brônquico (Figura 8 B) quanto no epitélio nasal (Figura 8 C) ( $p < 0,05$  para ambos os parâmetros).

Os tratamentos com SK e DX foram eficientes para reduzir a quantidade de muco ácido presentes no epitélio brônquico ( $p < 0,05$ ) e nasal ( $p < 0,001$ ), assim como a área do epitélio brônquico ( $p < 0,001$ ).

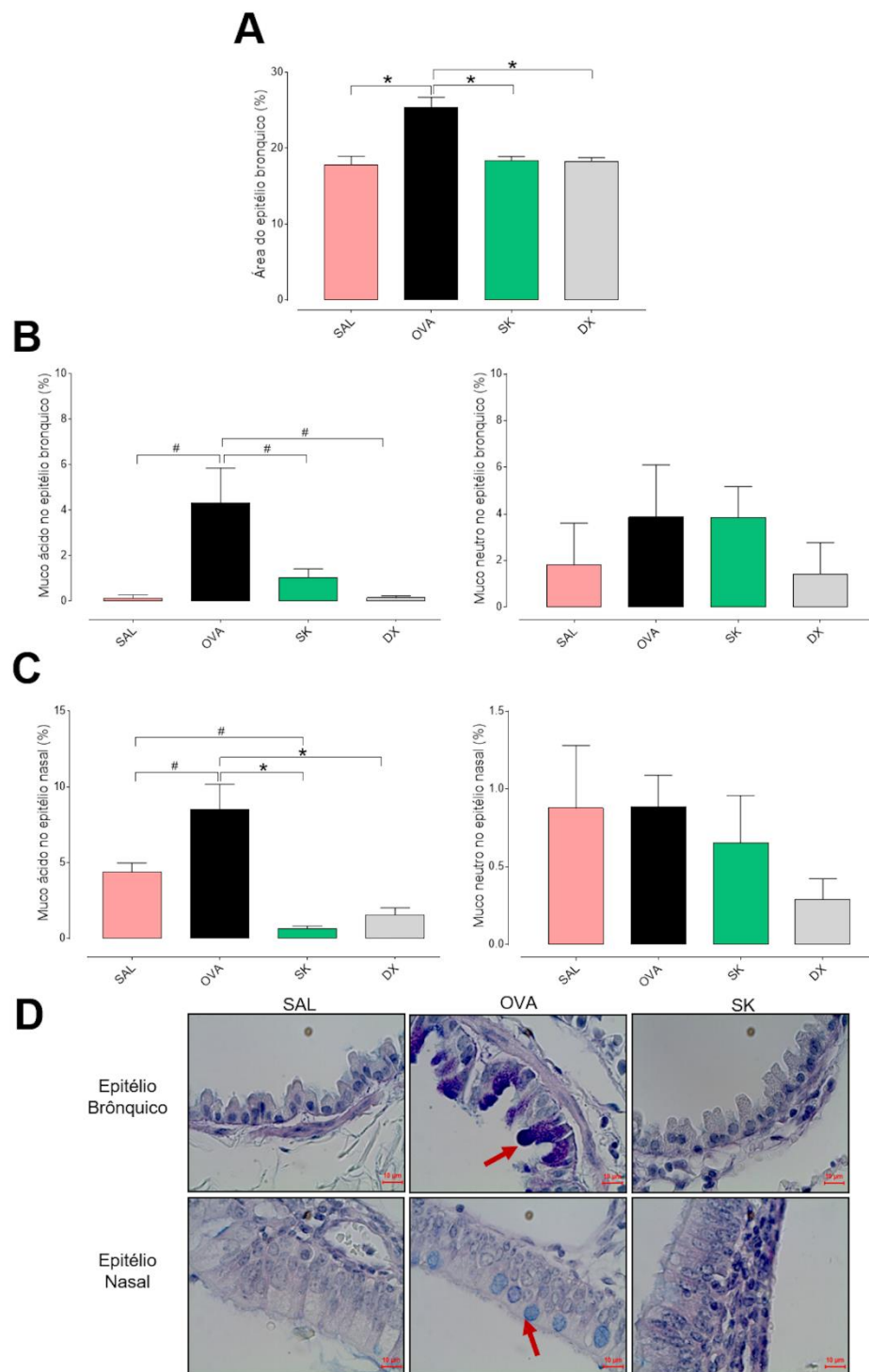


Figura 8. Sakuranetina (SK) reduz a área do epitélio brônquico assim como a produção de muco ácido no epitélio brônquico e nasal. (A) Porcentagem da área do epitélio brônquico; (B) Avaliação de muco ácido e neutro no epitélio brônquico; (C) Avaliação de muco ácido e neutro no epitélio nasal; (D) Fotomicrografias representativas dos grupos SAL, OVA e SK demonstrando a presença de muco ácido no epitélio brônquico e nasal (setas vermelhas). # $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, n de 5 a 8 animais por grupo

#### 4.1.3 A sakuranetina inibe citocinas de perfil Th2 e Th17 no pulmão de animais com asma experimental

Quantificou-se, no homogenato pulmonar, as principais citocinas inflamatórias descritas como participantes no processo inflamatório da asma. A sensibilização com OVA aumentou os níveis de citocinas de resposta do tipo Th2 como IL-4 ( $p<0,01$ ), IL-13 ( $p<0,01$ ) e RANTES ( $p<0,05$ ), além de aumentar os níveis da IL-17 (Th17) ( $p<0,05$ ). Neste modelo de inflamação crônica, não foi observado alterações quanto aos níveis de citocinas de resposta do tipo Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (Figura 9 A-F).

O tratamento com SK reduziu os níveis de IL-4 ( $p<0,01$ ), IL-13 ( $p<0,05$ ), RANTES ( $p<0,05$ ) e IL-17 ( $p<0,01$ ). O Tratamento com a DX foi eficiente na redução das citocinas IL-4 ( $p<0,01$ ), IL-13 ( $p<0,05$ ), RANTES ( $p<0,01$ ), mas não reduziu os níveis de IL-17.

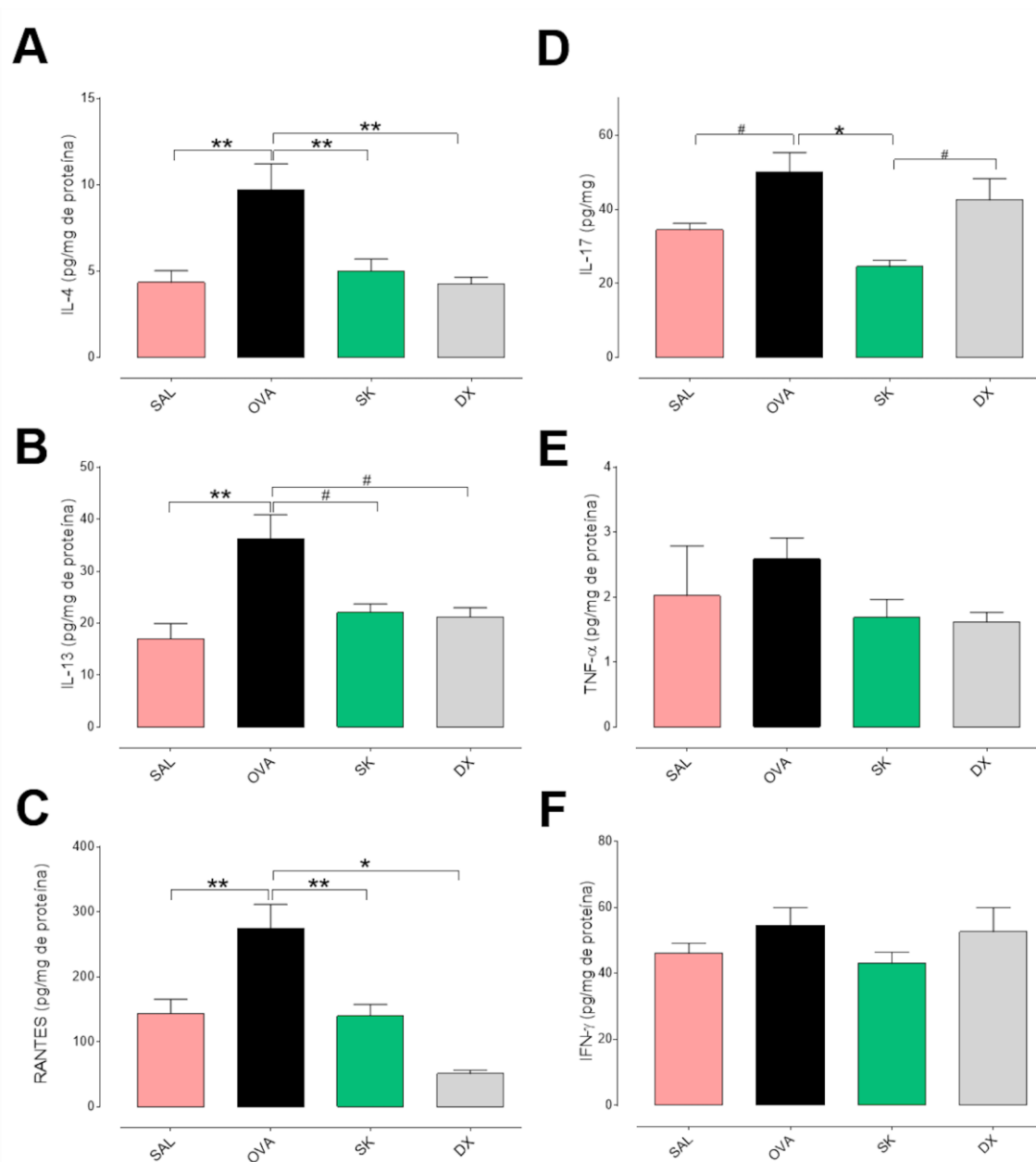


Figura 9. Sakuranetina (SK) inibiu citocinas Th2 e Th17 em homogenato pulmonar (pg/mg de proteína). As citocinas (A) IL-4, (B) IL-13, (C) RANTES e (D) IL-17 estavam aumentadas no grupo sensibilizado com OVA. O tratamento com SK e DX reduziram a liberação das citocinas do tipo Th2 (A-C), somente o tratamento com a sakuranetina foi eficiente na redução de IL-17 no homogenato pulmonar (D). As citocinas do tipo Th1, (E) TNF- $\alpha$  e (F) IFN- $\gamma$ , não apresentaram diferenças neste modelo experimental. # $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média  $\pm$  EPM, n de 6 a 9 animais por grupo.

#### 4.1.4 A sakuranetina inibiu a fosforilação dos três componentes da via MAPK no pulmão de animais com asma experimental

Para detecção dos componentes da via MAPK, foram avaliadas as expressões das proteínas p38, ERK1/2 e JNK no homogenato pulmonar pelo método de Western Blotting. Não foram observadas alterações quanto a expressão da proteína total de cada componente entre os grupos estudados.

Ao analisarmos a expressão da fosforilação dessas proteínas observamos que houve um aumento da fosforilação de p38 ( $p<0,001$ ), ERK1/2 ( $p<0,01$ ) e JNK ( $p<0,001$ ) no grupo OVA quando compara com o grupo SAL (Figura 10 B-E).

O grupo SK apresentou redução da expressão das proteínas p38 ( $p<0,001$ ), ERK1/2 ( $p<0,01$ ) e JNK ( $p<0,001$ ) comparada com o grupo OVA. Entretanto, o tratamento com a DX não foi eficiente para reduzir a expressão das proteínas p38 e ERK1/2, mostrando efeito somente na redução da JNK ( $p<0,01$ ).



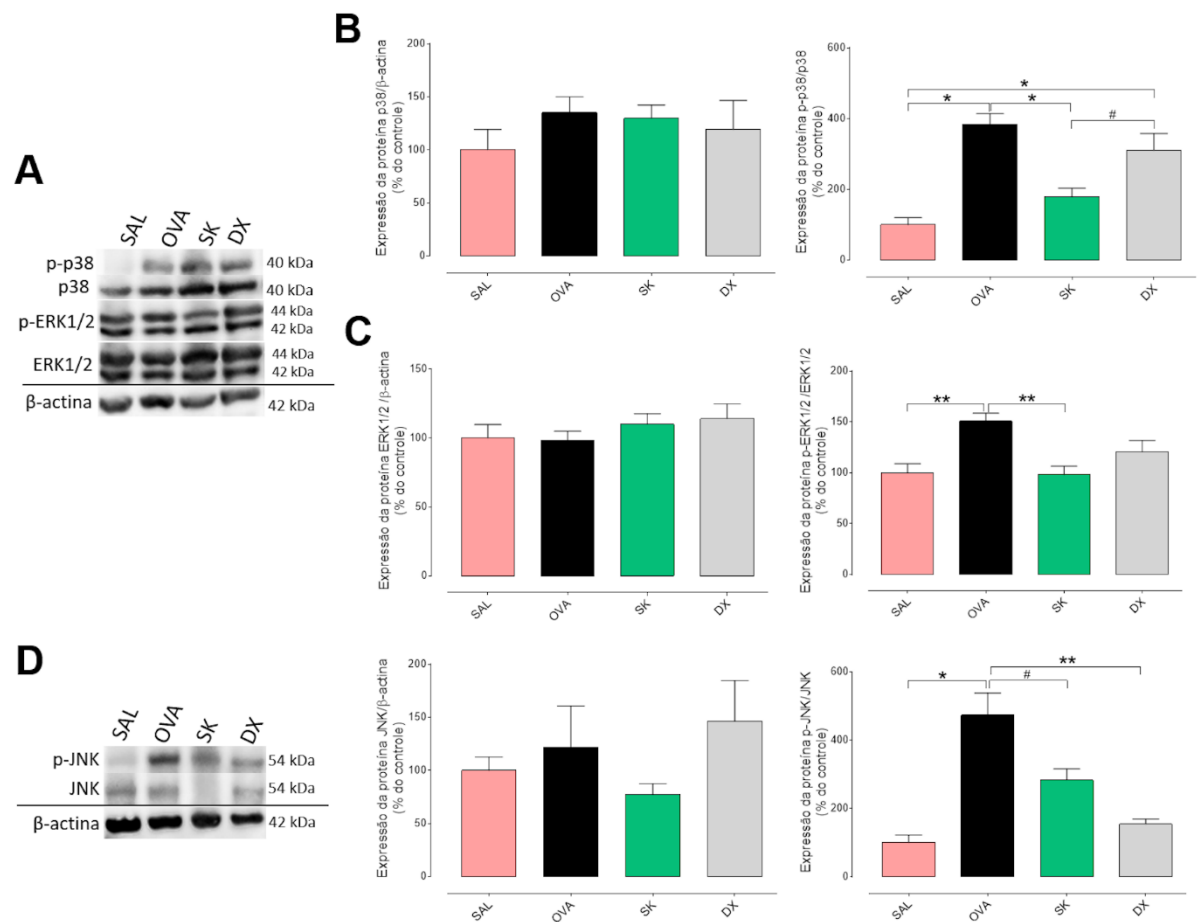


Figura 10. O tratamento com a sakuranetina (SK) inibiu componentes da via MAPK. (A) Imagem representativa da intensidade das bandas de p38 e ERK1/2 com seu constitutivo β-actina. (B) Expressão da proteína total de p38 e fosforilada no homogenato pulmonar. (C) Expressão da proteína ERK1/2 total e fosforilada no homogenato pulmonar. (D) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína JNK total e fosforilada. O grupo OVA aumentou a expressão das proteínas fosforiladas p38, ERK1/2 e JNK, o grupo tratado com SK reduziu a expressão proteica das três proteínas estudadas, enquanto o grupo tratado com DX somente reduziu a expressão da proteína p-JNK. # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média ± EPM, n de 5 a 8 animais por grupo.

#### 4.1.5 A sakuranetina inibiu a fosforilação de STAT3 no pulmão de animais com asma experimental

Para detecção dos componentes da via JAK2/STAT3/SOCS3, foram avaliadas as expressões das proteínas JAK2, STAT3 e SOCS3 no homogenato pulmonar pelo método de Western Blotting. Não foram observadas alterações quanto a expressão da proteína total de STAT3 entre os grupos estudados (Figura 11 A e C). Ao avaliarmos o grau de fosforilação da p-STAT3, observamos que houve um aumento no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL ( $p < 0,001$ ) assim como na expressão de SOCS3 ( $p < 0,01$ ) (Figura 11 A e B).

Os tratamentos com a SK e DX reduziram o grau de fosforilação da p-STAT3 ( $p < 0,01$  para ambos os tratamentos). Somente o tratamento com DX foi eficiente para reduzir a expressão de SOCS3 ( $p < 0,05$ ). Somente no grupo tratado com DX, foi observado um aumento da expressão da proteína JAK2, sendo significativamente diferente com os demais grupos ( $p < 0,01$  para grupo SAL e  $p < 0,05$  para grupos OVA e SK) (Figura 11 C).

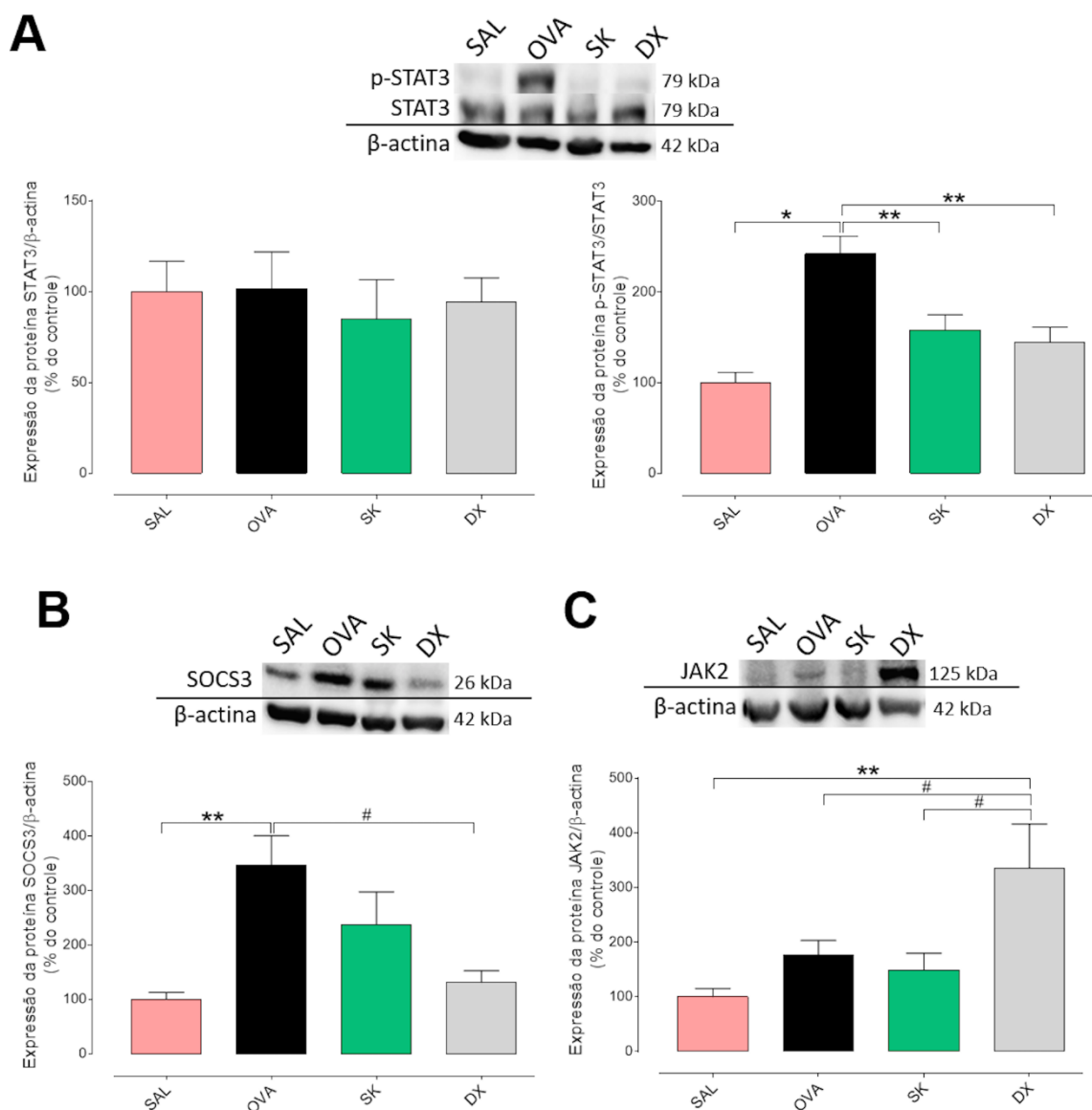


Figura 11. Sakuranetina (SK) inibiu a ativação de STAT3 fosforilada no homogenato pulmonar. (A) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína STAT3 total e fosforilada; (B) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína SOCS3; (C) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína JAK2 total. O grupo OVA aumentou a expressão das proteínas fosforiladas STAT3 e de SOCS3, o grupo tratado com SK reduziu a expressão da proteína p-STAT3, enquanto o grupo tratado com DX reduziu a expressão da proteína p-STAT3 e SOCS3, também foi observado neste grupo um aumento da expressão da proteína JAK2. # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, n de 5 a 8 animais por grupo.

#### 4.1.6 A sakuranetina reduziu os níveis proteicos de VACHT no pulmão de animais com asma experimental

O principal mediador do sistema colinérgico anti-inflamatório é a acetilcolina (ACh) que está intimamente ligada com os níveis de seu transportador, o VACHT. Avaliamos a expressão dos níveis de VACHT no pulmão e observamos que esta estava aumentada no grupo sensibilizado por OVA quando comparado ao seu controle SAL ( $p < 0,001$ ). Ambos os tratamentos com SK e DX reduziram os níveis dessa proteína ( $p < 0,05$  para ambos os tratamentos), entretanto os níveis de VACHT de ambos os grupos tratados não voltaram em seus valores basais, sendo diferentes em relação ao grupo SAL ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

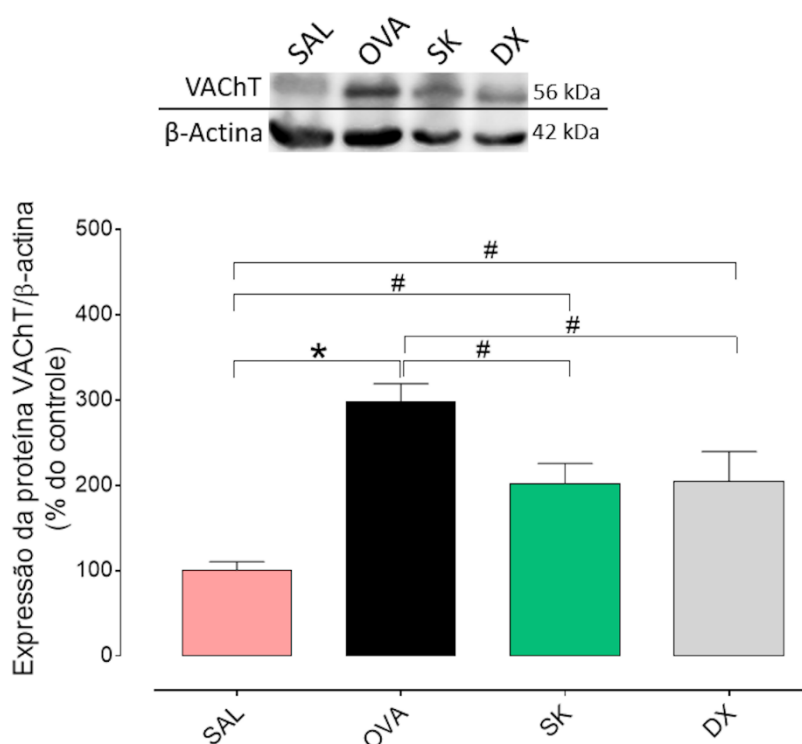


Figura 12. Sakuranetina (SK) reduziu a expressão da proteína VACHT no homogenato pulmonar. Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína VACHT. O grupo OVA aumentou a expressão desta proteína, os grupos tratados com SK e DX reduziram a expressão da proteína VACHT, no entanto, mantiveram-se aumentados quando comparados com o grupo SAL. # $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média  $\pm$  EPM, n de 6 a 7 animais por grupo.

#### 4.1.7 O tratamento com sakuranetina não induz alterações morfológicas no fígado de animais com asma experimental

Para avaliarmos indiretamente a toxicidade do tratamento com o flavonoide sakuranetina, foi realizada a pesagem do fígado corrigido pela massa corpórea de cada animal e a análise histopatológica do tecido hepático de cada grupo estudado. Não foram observadas nenhuma alteração tecidual e nenhum aumento da porcentagem de massa do fígado nos grupos estudados (Figura 13).

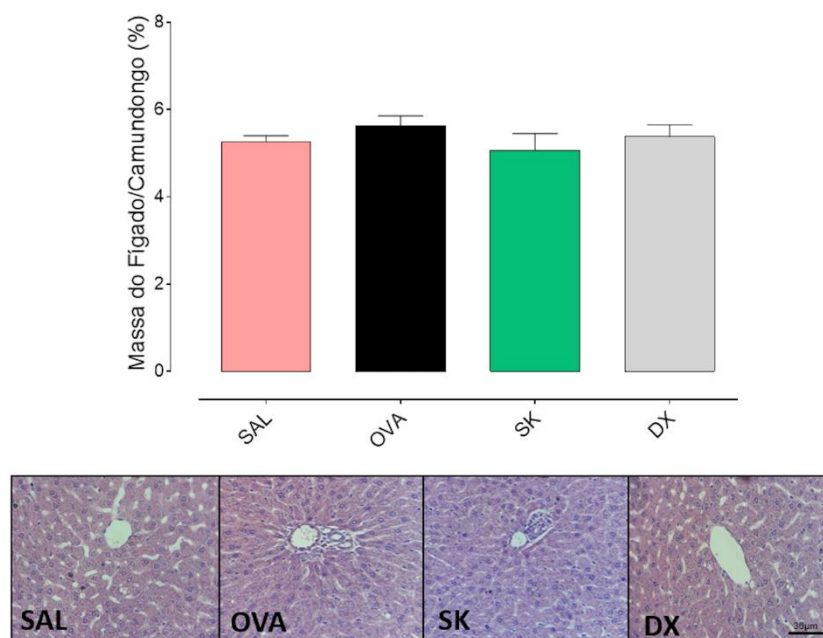


Figura 13. Toxicidade *in vivo* no tecido do fígado com os grupos do subprojeto 1. Massa do fígado em relação ao peso corporal por animal e fotomicrografias representativas do tecido hepático dos grupos estudados, sem alterações patológicas evidentes. Dados apresentados com Média±EPM, n de 7 a 8 animais por grupo.

#### 4.1.8 A sakuranetina não induz toxicidade *in vitro* em células RAW 264,7

Para avaliar a toxicidade do flavonoide sakuranetina, foi utilizado macrófagos da linhagem RAW 264,7 e realizada uma curva-dose de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  de sakuranetina para quantificação da viabilidade celular. Não houve diferença estatística em nenhuma das doses estudadas, demonstrando que a sakuranetina administrada em células nessas doses não apresenta ação tóxica (Figura 14).

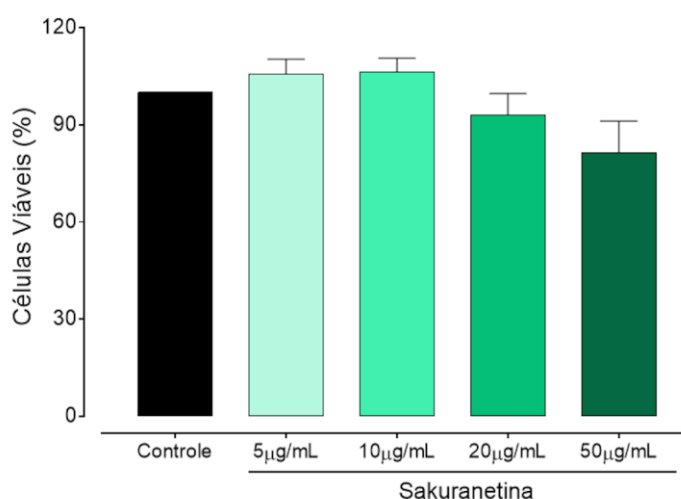


Figura 14. Viabilidade celular em diferentes doses de sakuranetina em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264,7. Não houve diferença em nenhuma dose estudada em relação ao controle. Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, em cada grupo foi utilizado um *pull* de células em duplicata.

#### 4.1.9 A sakuranetina não captura radicais livres pelo método de DPPH

Para avaliarmos se o flavonoide sakuranetina captura radicais livres, foi utilizado o método de DPPH com uma curva de 1 a 500  $\mu\text{g/mL}$  de controle positivo ácido gálico e de sakuranetina. Não foi observado atividade na captura de radicais livres em nenhuma dose estudada de sakuranetina (Figura 15 A).

#### 4.1.10 A sakuranetina reduz a produção de NO em células RAW 264,7 estimuladas com LPS

As células da linhagem RAW 264,7 foram estimuladas com LPS para induzir a liberação de óxido nítrico (NO) e tratadas com diferentes doses de sakuranetina (5 a 50 µg/mL). A SK reduziu a liberação de NO nas doses de 5 e 20 µg/mL quando comparado com o grupo que foi estimulado com LPS ( $p < 0,05$  para SK 5 µg/mL e  $p < 0,01$  para SK 20 µg/mL) (Figura 15 B).

#### 4.1.11 A sakuranetina reduz a expressão de IL-1 $\beta$ e IL-6 em células RAW 264,7 estimuladas com LPS

Considerando as citocinas pro-inflamatórias produzidas pelas células RAW 264,7 após estímulo com LPS, foram analisadas as expressões de mRNA de IL-6 e IL-1 $\beta$  nas doses de 5 a 20 µg/mL de sakuranetina. Todas as doses estudadas apresentaram uma redução da expressão de IL-1 $\beta$  (Figura 15 C) e de IL-6 (Figura 15 D) quando comparado ao grupo controle positivo (C.P.) exposto ao LPS.

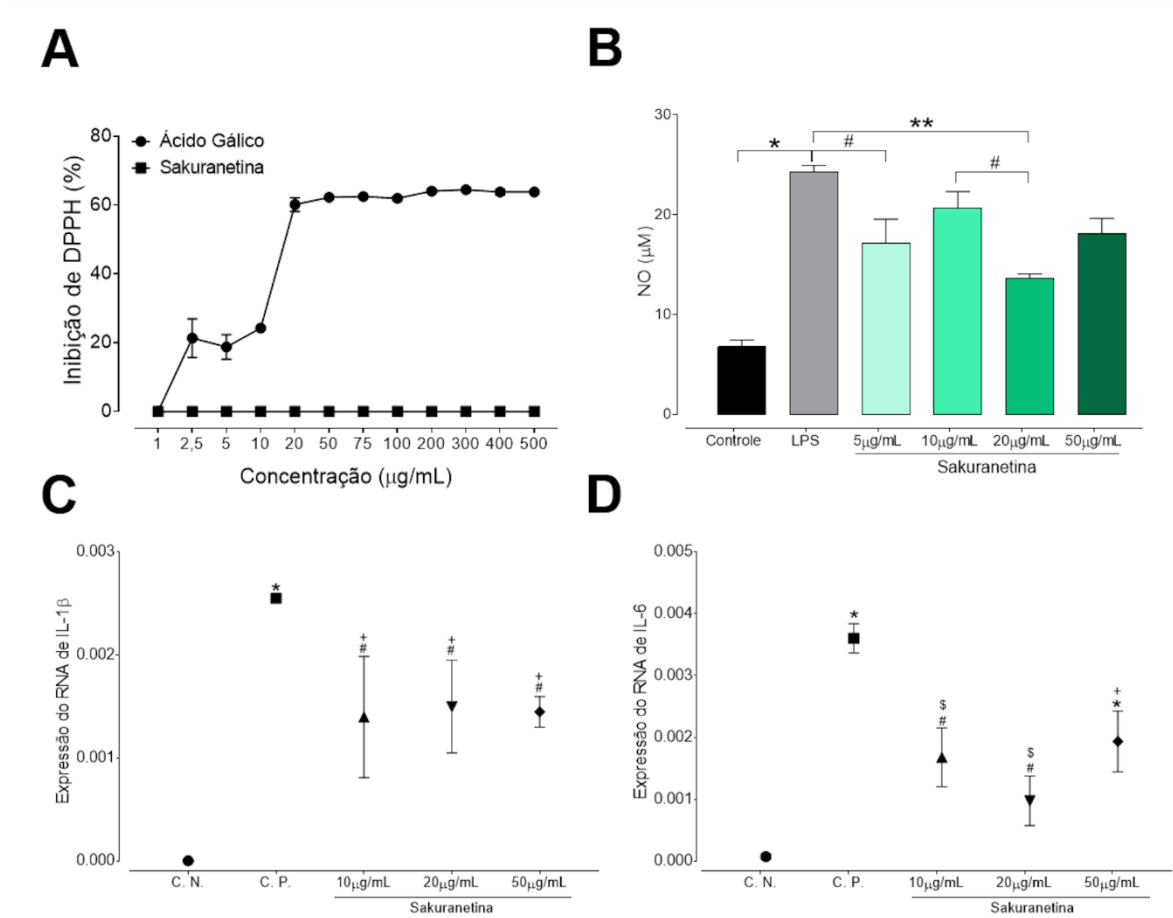


Figura 15. Sakuranetina (SK) reduziu óxido nítrico e citocinas IL-1β e IL-6 em linhagem celular RAW 264,7. (A) Porcentagem de inibição de radicais livres, nenhum efeito da SK foi observado. (B) As doses de 5 e 20 μg/mL de SK reduziu óxido nítrico quando comparado com o grupo de células expostos ao LPS, # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . (C) Todas as doses de SK reduziram a expressão de IL-1β e de (D) IL-6 quando comparados com o controle positivo exposto a LPS; # $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$  comparado com o grupo SAL, \* $p < 0,05$  e \$ $p < 0,001$  comparado com grupo OVA. Dados apresentados com Média±EPM, em cada grupo foi utilizado um *pull* de células em duplicata.



## 4.2 Avaliação das ações anti-inflamatórias e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas

### 4.2.1 Curva dose resposta ao eugenol para determinação da melhor dose do tratamento

Conforme descrito anteriormente, inicialmente fez-se uma curva dose-resposta ao eugenol (EUG) (5, 10 e 20 mg/kg) em animais sensibilizados com OVA. Esses grupos foram avaliados quanto aos parâmetros característicos da asma brônquica e usualmente bem reproduzidos neste modelo experimental, como a resistência do sistema respiratório (Rrs) e o número de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, no lavado broncoalveolar (LBA) (Figura 16).

Ao avaliarmos a resposta da maior dose de metacolina na resistência do sistema respiratório (Rrs), observamos que o grupo OVA apresentou um aumento neste parâmetro. A dose de 10 mg/kg de EUG (grupo OVA-EUG10) demonstrou ser eficiente na redução da hiperresponsividade brônquica quando comparados ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ) (Figura 16 A). A curva dose-reposta está representada no gráfico da Figura 16 no intervalo de 2 minutos da administração da maior dose de metacolina.

As células inflamatórias e os eosinófilos no LBA apresentavam-se aumentados no grupo OVA, quando comparado ao grupo SAL ( $p < 0,01$ ). Entretanto, ao avaliarmos o efeito das diferentes doses, apenas o grupo EUG 5 mg/kg apresentou uma diminuição do número de células e de eosinófilos em relação ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). As doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg não apresentaram uma redução significativa das células inflamatórias totais e nem dos eosinófilos do LBA. (Figura 16 B)

Conforme as análises realizadas e os resultados obtidos quanto as três doses de eugenol estudadas, optamos por utilizar a dose de 10 mg/kg para continuidade deste estudo, sendo efetiva na hiperresponsividade brônquica e apresentando uma tendência na redução das células inflamatórias do LBA. Desta forma, para os estudos com a molécula bis-eugenol, dímero do eugenol, escolheu-se a mesma dose de tratamento utilizada para o eugenol, de 10 mg/kg.

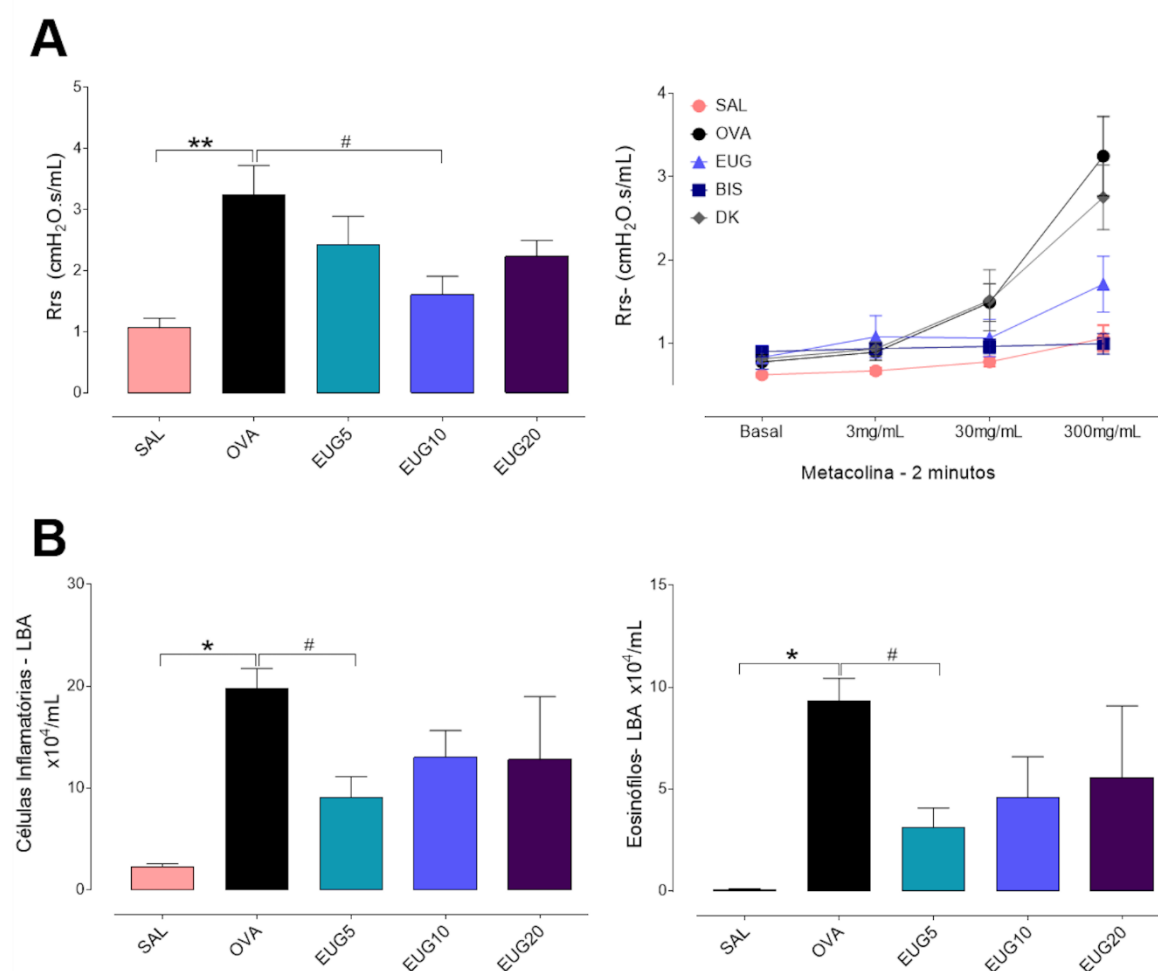


Figura 16. Parâmetros avaliados para escolha da dose de tratamento do eugenol (EUG) (5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg). (A) Resposta da dose máxima de metacolina (300 µg/mL) da resistência do sistema respiratório (Rrs) e representação da curva dose-resposta a metacolina após 2 minutos inalada. O grupo OVA apresenta um aumento quanto a resistência do tecido e somente a dose de 10 mg/kg reduziu de forma significativa. (B) Células totais e eosinófilos no lavado broncoalveolar (LBA) estavam aumentados no grupo OVA, o grupo EUG 5 mg/kg reduziu esses parâmetros. Após esses dados, optamos por continuar os experimentos com a dose de 10 mg/kg. #p<0,05, \*\*p<0,01 e \*p<0,001. Dados apresentados com Média±EPM, n de 5 a 8 animais por grupo.

#### 4.2.2 O bis-eugenol reduz a responsividade brônquica em animais com asma experimental

A responsividade brônquica foi avaliada pela resposta obtida na curva dose-resposta à metacolina na dose de 300 µg/mL de cada grupo com as análises de resistência do sistema respiratório (Rrs), de elastância do sistema respiratório (Ers) (Figura 17 A-B), de resistência do tecido pulmonar (Gtis), e elastância do tecido pulmonar (Htis) e resistência das vias áreas (Raw) (Figura 18 A-C).

Os valores da resposta na dose de 300 µg/mL de metacolina de Rrs estavam aumentados no grupo OVA em relação ao grupo SAL ( $p<0,001$ ). Os tratamentos com eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) reduziram significativamente esta resposta ( $p<0,05$  para EUG e  $p<0,001$  para BIS). Não houve efeito no grupo tratado com dexametasona (DX). Podemos observar no gráfico a curva das doses de metacolina de cada grupo quanto ao parâmetro de Rrs (Figura 17 A).

Ao ser avaliado o valor da resposta na dose de 300 µg/mL de metacolina de Ers, o grupo OVA apresentou um aumento quando comparado ao grupo SAL ( $p<0,05$ ) (Figura 17 B). O tratamento com BIS induziu uma redução deste parâmetro quando comparado com o grupo OVA ( $p<0,05$ ). Nenhuma alteração quanto ao grupo tratado com EUG e DX foi observada. Podemos observar no gráfico a curva das doses de metacolina de cada grupo quanto ao parâmetro de Ers (Figura 17 B).

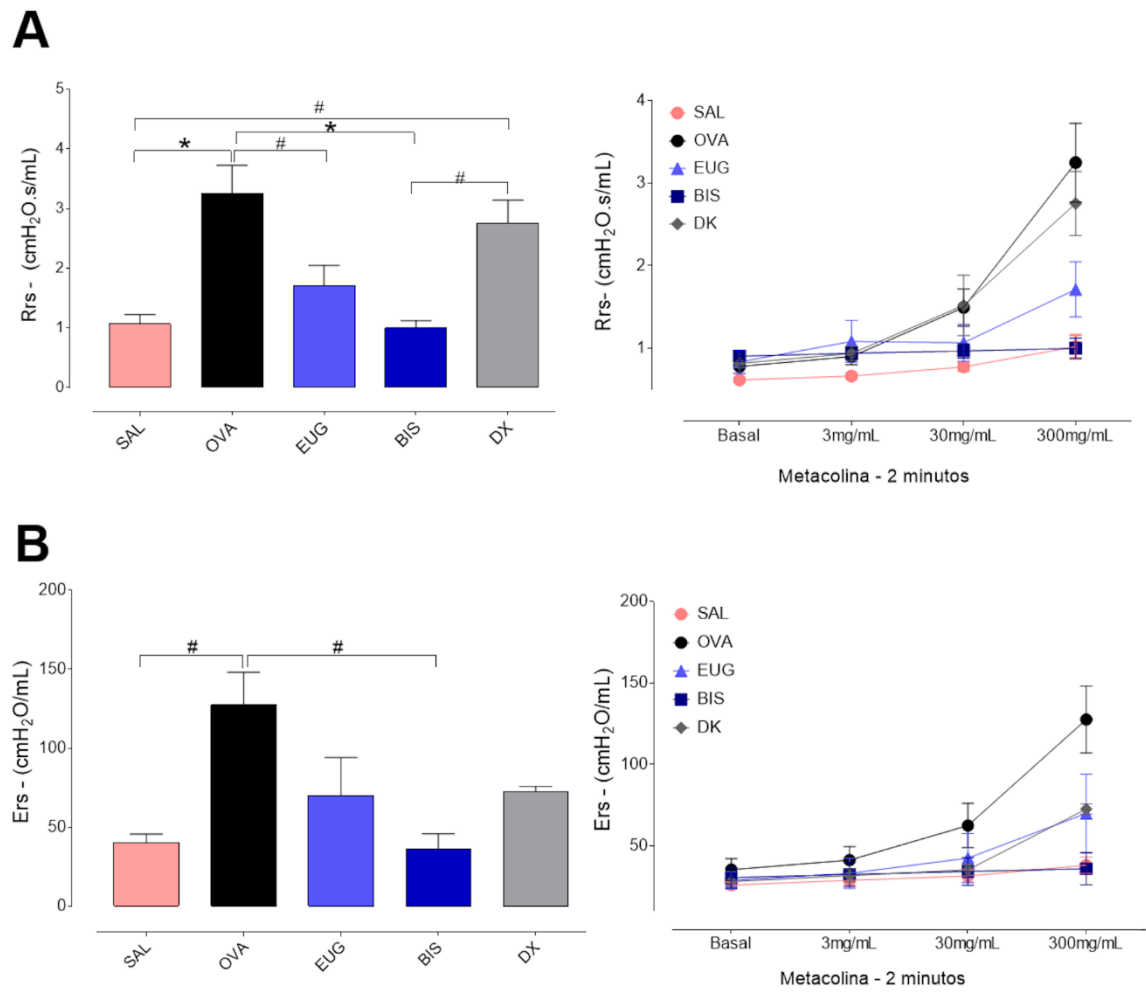


Figura 17. Efeito do eugenol (EUG) e do bis-eugenol (BIS) na responsividade brônquica. (A) Resposta da maior dose de metacolina (300 µg/mL) e curva dose-resposta de metacolina da resistência do sistema respiratório (Rrs). (B) Resposta da maior dose de metacolina (300 µg/mL) e curva dose-resposta à metacolina da elastância do sistema respiratório (Ers). # $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média  $\pm$  EPM, n de 3 a 7 animais por grupo.

Na análise da resistência (Gtis) do tecido pulmonar na resposta na dose de 300 mg/mL metacolina, o grupo OVA apresentou um aumento quando comparado ao grupo SAL ( $p<0,01$ ) (Figura 18 A). Os tratamentos com EUG e BIS induziram uma diminuição significativa deste parâmetro quando comparados com o grupo OVA ( $p<0,01$ ). Nenhuma alteração quanto ao grupo tratado com DX foi observada. Em relação ao Htis, não foi observado diferença entre os grupos experimentais. Podemos observar no gráfico a curva das doses de metacolina de cada grupo quanto aos parâmetros de Gtis e Htis (Figura 18 A-B).

Quando ao índice do Raw, houve um aumento no grupo OVA ( $p<0,05$ ) e somente o grupo tratado com o BIS mostrou redução deste parâmetro ( $p<0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos EUG e DX para Raw. Podemos observar no gráfico a curva das doses de metacolina de cada grupo quanto ao parâmetro Raw (Figura 18 C).

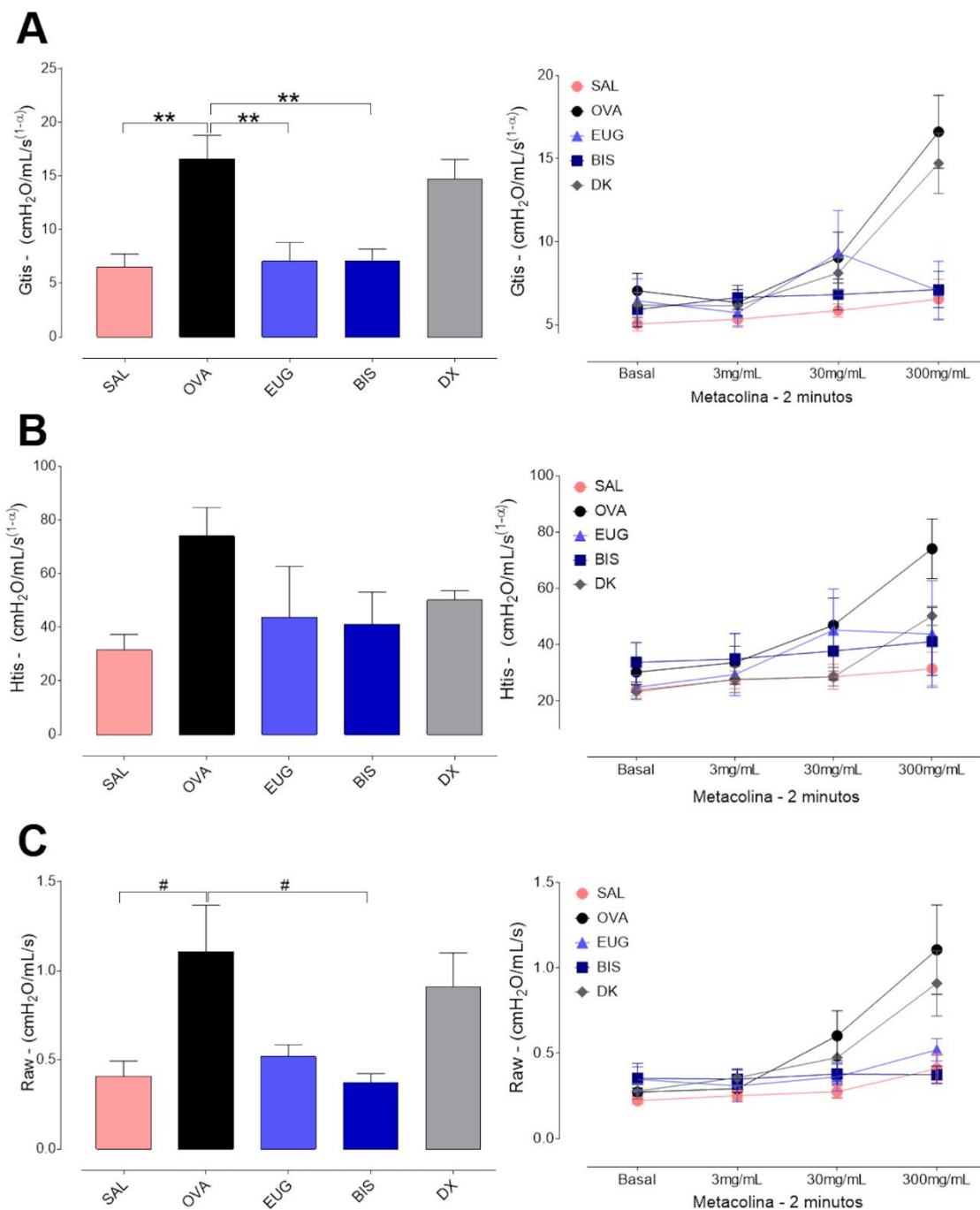


Figura 18. Efeito do eugenol (EUG) e do bis-eugenol (BIS) na responsividade do tecido pulmonar e vias aéreas. (A) Resposta da maior dose de metacolina (300 µg/mL) e curva dose-resposta de metacolina da resistência do tecido pulmonar (Gtis). (B) Resposta da maior dose de metacolina (300 µg/mL) e curva dose-resposta de metacolina da elastância do tecido pulmonar (Htis). (C) Resposta da maior dose de metacolina (300 µg/mL) e curva dose-resposta de metacolina da resistência das vias aéreas (Raw). #p<0,05 e \*p<0,001. Dados apresentados com Média±EPM, n de 3 a 7 animais por grupo.

#### 4.2.3 O bis-eugenol reduz a resposta alérgica e inflamatória em animais com asma experimental

Os dados de células do lavado da medula óssea, do sangue periférico, do lavado broncoalveolar (LBA) e dos níveis de IgE, IgG1 e IgG2a, assim como a porcentagem do timo e do baço, estão demonstrados na Tabela 6.

Não houve alteração quanto ao número de células encontrada na medula óssea nos grupos estudados. Quanto aos leucócitos totais no sangue periférico, não houve diferença entre os grupos OVA e SAL, no entanto, o grupo de animais que foram sensibilizados com OVA e tratados com DX apresentaram uma redução de leucócitos em relação ao grupo OVA e BIS ( $p<0,05$ ). Quanto a diferenciação celular, este modelo apresentou um aumento de células polimorfonucleares no sangue ( $p<0,05$ ), e somente o grupo EUG reduziu o número dessas células quando comparado com o grupo OVA ( $p<0,05$ ). Não houve diferença significativa quanto aos números de células mononucleares presentes no sangue dos grupos estudados.

Foi analisado a inflamação pulmonar pela contagem de células inflamatórias no LBA. As células inflamatórias totais presentes no LBA estavam aumentadas no grupo sensibilizado OVA comparado com seu controle SAL ( $p<0,001$ ). Os tratamentos com BIS e DX reduziram a presença dessas células inflamatórias ( $p<0,001$ ), no entanto não foi observado esta redução quanto ao grupo tratado com EUG (Tabela 6). Ao avaliar o perfil das células inflamatórias presentes no LBA, o grupo sensibilizado por OVA apresentou aumento de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos ( $p<0,001$ ). O tratamento com BIS reduziu os números de eosinófilos ( $p<0,001$ ), linfócitos ( $p<0,001$ ) e macrófagos ( $p<0,05$ ) semelhante ao observado no grupo tratado com DX ( $p<0,001$ ), além de reduzir o número de neutrófilos ( $p<0,05$ ). Já o grupo

tratado com EUG reduziu somente linfócitos quando comparado com o grupo OVA ( $p<0,05$ ) (Tabela 6).

Na dosagem de anticorpos OVA-específicos no plasma, o processo de sensibilização com ovoalbumina aumentou os níveis dos anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a quando comparado com o grupo controle SAL ( $p<0,001$  para IgE e IgG1;  $p<0,05$  para IgG2a) (Tabela 6). Nenhum dos grupos tratados apresentaram redução dos níveis desses anticorpos.

Para avaliarmos indiretamente a resposta imunidade dos grupos estudados, foi realizada a pesagem do timo e do baço corrigidos pela massa corpórea de cada animal. O grupo OVA induziu um aumento da porcentagem do baço ( $p<0,05$ ) e um aumento da porcentagem de massa do timo ( $p<0,05$ ) em relação ao peso dos animais quando comparado com o grupo SAL. Todos os tratamentos reduziram a porcentagem da massa do baço ( $p<0,05$  para EUG e  $p<0,001$  para BIS e DX), e a porcentagem da massa do timo ( $p<0,05$  para EUG e BIS e  $p<0,001$  para DX) (Tabela 6).



Tabela 6. Efeito do tratamento com eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) nos parâmetros inflamatórios e resposta imune. A exposição de OVA resultou no aumento de células inflamatórias no sangue (cels/mm<sup>3</sup>), como eosinófilos, e no lavado broncoalveolar (LBA, 10<sup>4</sup> cels/mL), como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos, IgE e IgG2a no plasma (OD) e aumento da massa de órgãos imune (%). #p<0,05 comparado com grupo SAL; \*p<0,001 comparado com o grupo SAL; +p<0,05 comparado com grupo OVA; \$p<0,001 comparado com grupo OVA; °p<0,05 comparado com grupo EUG. Dados apresentados com Média±EPM, n de 4 a 8 animais por grupo.

Dados/Grupos	SAL	OVA	EUG	BIS	DX
<b>Medula Óssea x 10<sup>6</sup> cels/mL</b>					
Células totais	74,42±18,51	120±23,29	118,3±16,58	118,2±51,98	89,43±18,83
<b>Sangue x cels/mm<sup>3</sup></b>					
Leucócitos	7175±1136	12886±1506	8400±2239	12930±996,7	<sup>+, °</sup> 4913±1339
Mononucleares	3268±615,1	4620±1063	4457±2008	6309±758,5	808,4±472,1
Polimorfonucleares	3907±1052	<sup>#</sup> 8266±1840	<sup>+</sup> 3943±814,6	6621±699,3	4104±874,1
<b>LBA x 10<sup>4</sup> cels/mL</b>					
Células totais	2,25±0,33	<sup>*</sup> 19,78±1,95	<sup>*,+</sup> 13,02±2,61	<sup>\$,°</sup> 5,07±0,84	<sup>\$,°</sup> 3,19±0,34
Macrófagos	2,06±0,32	<sup>*</sup> 9,10±1,33	<sup>#</sup> 6,85±1,31	<sup>\$</sup> 4,36±0,73	<sup>+,°</sup> 2,39±0,30
Linfócitos	0,09±0,02	<sup>*</sup> 1,35±0,35	<sup>+</sup> 0,35±0,08	<sup>\$</sup> 0,12±0,05	<sup>\$</sup> 0,12±0,03
Neutrófilos	0,02±0,01	<sup>*</sup> 0,85±0,25	0,34±0,08	<sup>\$</sup> 0,03±0,02	0,50±0,09
Eosinófilos	0,07±0,04	<sup>*</sup> 8,46±1,46	<sup>#</sup> 4,59±1,99	<sup>\$</sup> 0,56±0,11	<sup>\$,°</sup> 0,18±0,06
<b>Anticorpos OVA específicos (OD)</b>					
IgE	0,20±0,14	<sup>*</sup> 1,95±0,31	<sup>#</sup> 1,67±0,15	1,30±0,32	1,29±0,45
IgG1	1,23±0,24	<sup>*</sup> 2,52±0,01	<sup>#</sup> 2,07±0,18	<sup>#</sup> 2,26±0,15	<sup>#</sup> 2,45±0,01
IgG2a	0,06±0,01	<sup>#</sup> 1,92±0,49	<sup>#</sup> 2,12±0,41	1,43±0,91	1,75±0,91
<b>Órgãos / Massa (g)/Camundongo (%)</b>					
Timo	0,19±0,03	<sup>#</sup> 0,28±0,01	<sup>+</sup> 0,16±0,01	<sup>+</sup> 0,18±0,027	<sup>\$</sup> 0,11±0,02
Baço	0,40±0,03	<sup>*</sup> 0,54±0,03	<sup>+</sup> 0,31±0,05	<sup>\$</sup> 0,29±0,02	<sup>\$,°, °</sup> 0,22±0,02

#### 4.2.4 Eugenol e bis-eugenol inibem citocinas de perfil Th2 e Th17 no pulmão de animais com asma experimental

Quantificamos as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, RANTES, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , presentes no processo inflamatório da asma. A sensibilização com OVA aumentou os níveis de citocinas de resposta do tipo Th2 como IL-4 ( $p<0,01$ ), IL-13 ( $p<0,001$ ) e RANTES ( $p<0,05$ ), os níveis da IL-17 (Th17) ( $p<0,05$ ), além dos níveis de citocinas IL-6 ( $p<0,05$ ). Neste modelo de inflamação crônica, não foi observado alterações quando aos níveis de citocinas de resposta do tipo Th1, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 (Figura 19 E, F e H).

Tanto o tratamento com EUG quanto com BIS reduziram os níveis de IL-4 (EUG:  $p<0,01$  e BIS:  $p<0,05$ ), IL-13 ( $p<0,001$  para ambos), e IL-17 (EUG:  $p<0,001$  e BIS:  $p<0,01$ ) (Figura 19 A, B e D). Além disso, os tratamentos com EUG e BIS reduziram os níveis de IL-10 quando comparado com o grupo OVA ( $p<0,001$  para ambos) (Figura 19 H).

O Tratamento com DX foi eficiente na redução das citocinas IL-4 ( $p<0,05$ ), IL-13 ( $p<0,001$ ), RANTES ( $p<0,001$ ), porém não reduziu os níveis de IL-17.

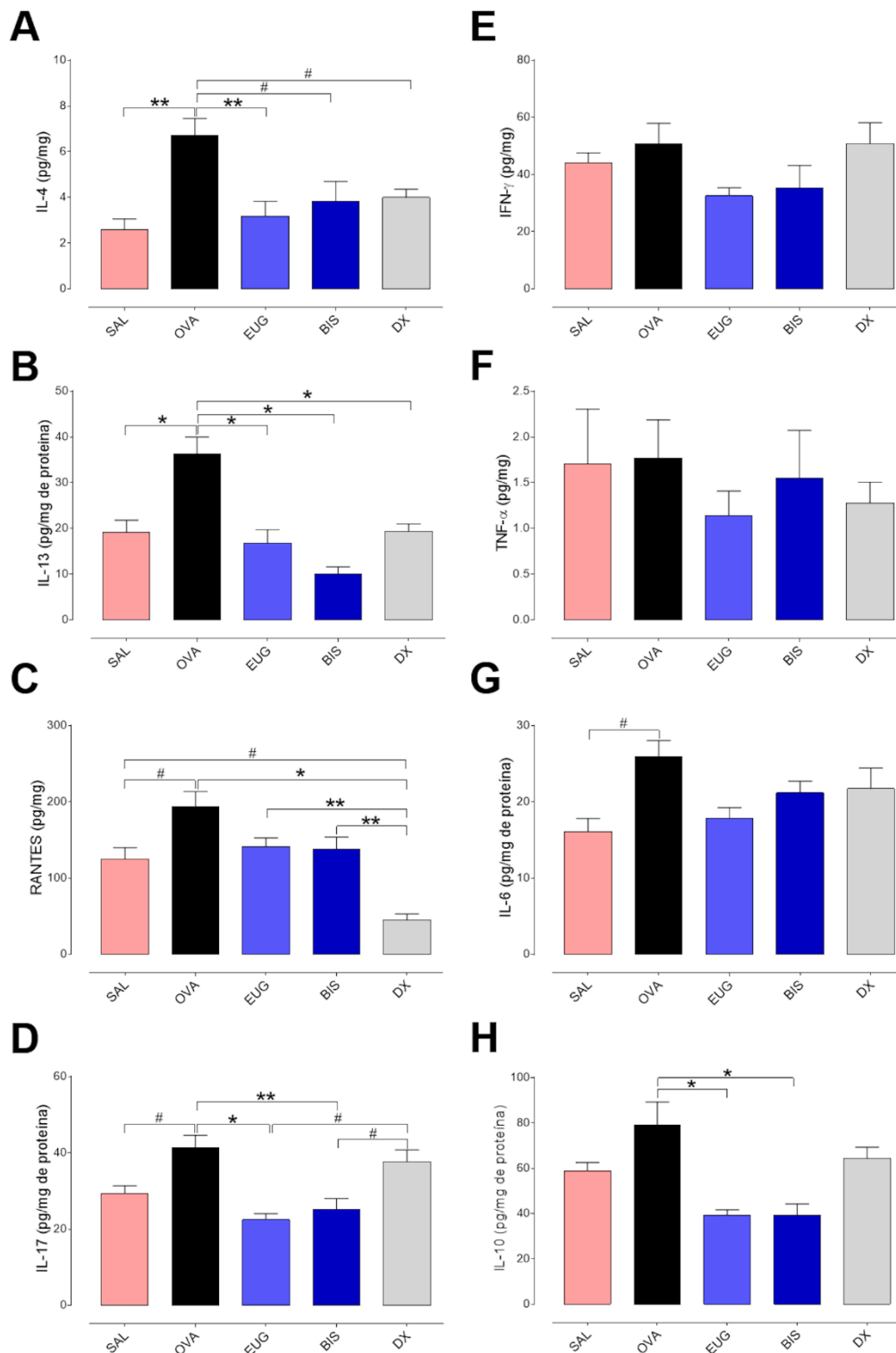


Figura 19. Tratamentos com eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) inibiram citocinas Th2 e Th17 no pulmão (pg/mg de proteína). As citocinas (A) IL-4, (B) IL-13, (C) RANTES, (D) IL-17 e (G) IL-6 estavam aumentadas no grupo sensibilizado com OVA. Os tratamentos com EUG e BIS reduziram as citocinas do tipo Th2 (A e B), IL-17 (D) e as citocina IL-10 (H). Já o tratamento com a dexametasona (DX), reduziu as citocinas de Th2 (A-C) porém não reduziu a IL-17 (D). As citocinas do tipo Th1, (E) TNF- $\alpha$  e (F) IFN- $\gamma$ , não apresentaram diferença neste modelo experimental. # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, n de 6 a 9 animais por grupo.

#### 4.2.5 O bis-eugenol reduz a fosforilação da MAPK no pulmão de animais com asma experimental

Os componentes da via MAPK, p38, ERK1/2 e JNK, foram avaliados pelo método de Western Blotting. Não foram observadas alterações quanto a expressão da proteína total de cada componentes entre os grupos estudados (Figura 20 A-D).

Ao analisarmos a expressão dessas proteínas fosforiladas observamos que, houve um aumento do grau de fosforilação da p38 ( $p<0,001$ ), ERK1/2 ( $p<0,01$ ) e JNK ( $p<0,001$ ) no grupo OVA quando comparado com o grupo SAL (Figura 20).

O grupo tratado com BIS reduziu a expressão das proteínas p38 ( $p<0,01$ ), ERK1/2 ( $p<0,01$ ) e JNK ( $p<0,01$ ) comparada com o grupo OVA ( $p<0,01$  para todas as análises). Entretanto, o tratamento com a DX não foi eficiente para reduzir a expressão das proteínas p38, mostrando somente efeito na redução da JNK e da ERK1/2 ( $p<0,05$ ). Não foi observado nenhum efeito quanto ao grupo tratado com EUG (Figura 20).

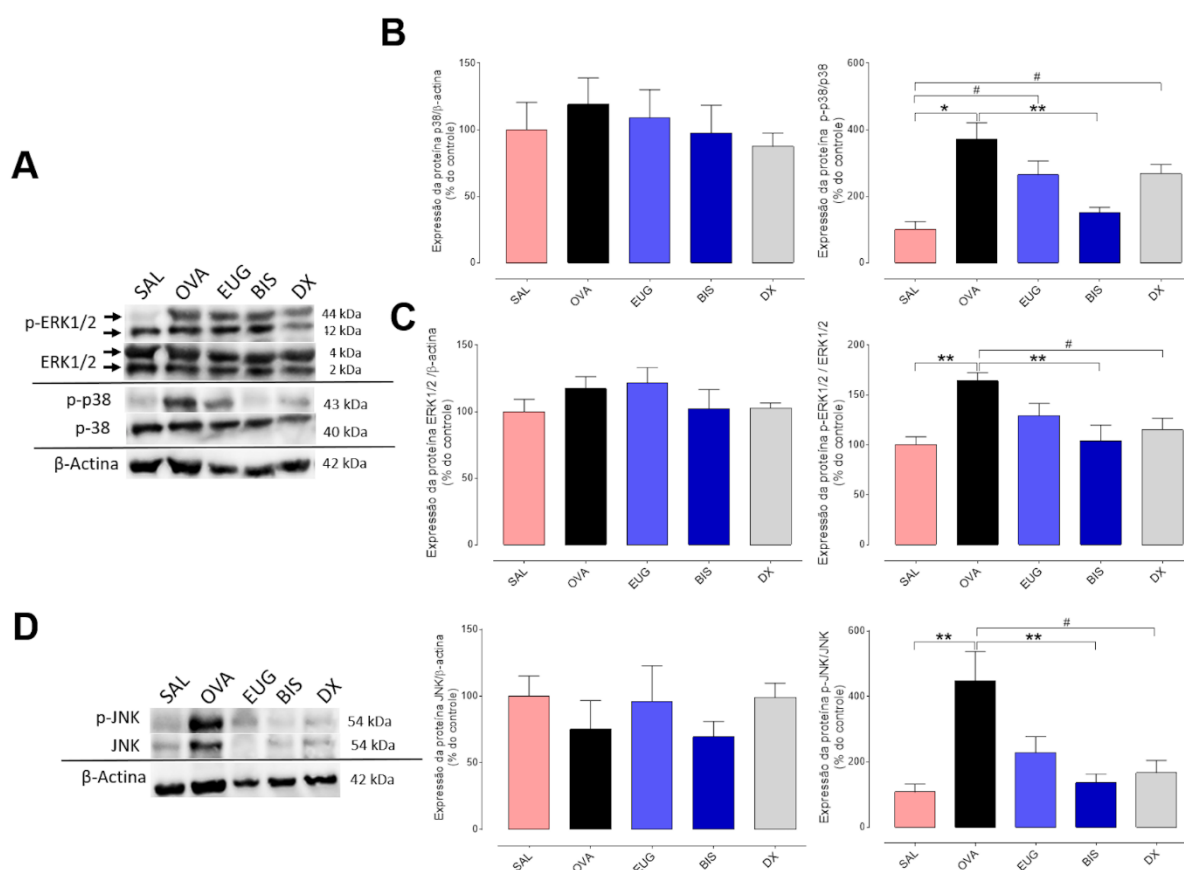


Figura 20. Efeito do eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) na via MAPK. (A) Imagem representativa da intensidade das bandas de p38 e ERK1/2 com seu constitutivo  $\beta$ -actina. (B) Expressão da proteína total de p38 e fosforilada no homogenato pulmonar. (C) Expressão da proteína ERK1/2 total e fosforilada no homogenato pulmonar. (D) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína JNK total e fosforilada. O grupo OVA aumentou a expressão das proteínas fosforiladas p38, ERK1/2 e JNK, o grupo tratado com BIS reduziu todas desta via, enquanto o grupo tratado com DX somente reduziu a expressão da proteína p-JNK e ERK1/2. # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média  $\pm$  EPM, n de 5 a 7 animais por grupo.

#### 4.2.6 O bis-eugenol reduz a fosforilação de STAT3 e SOCS 3 em pulmão de animais com asma experimental

Para avaliação dos componentes da via JAK2/STAT3/SOCS3, foram avaliadas as expressões das proteínas JAK2, STAT3 e SOCS3 no homogenato pulmonar pelo método de Western Blotting. Não foram observadas alterações quanto a expressão da proteína total de STAT3 entre os grupos estudados. Quanto o grau de expressão da fosforilação de p-STAT3, observamos um aumento no grupo OVA quando comparado ao grupo SAL ( $p<0,001$ ), e os grupos tratados com EUG, BIS e DX reduziram a expressão desta proteína ( $p<0,01$  para todas as comparações) (Figura 21 A).

Foi observado também, no grupo sensibilizado com OVA, um aumento da expressão da proteína SOCS3 comparado ao grupo SAL ( $p<0,001$ ) e os tratamentos com BIS e DX reduziram esta proteína ( $p<0,05$  para BIS e  $p<0,01$  para DX) (Figura 21 B). Não foi observado diferença entre os grupos quanto a expressão da proteína JAK2. (Figura 21 C).

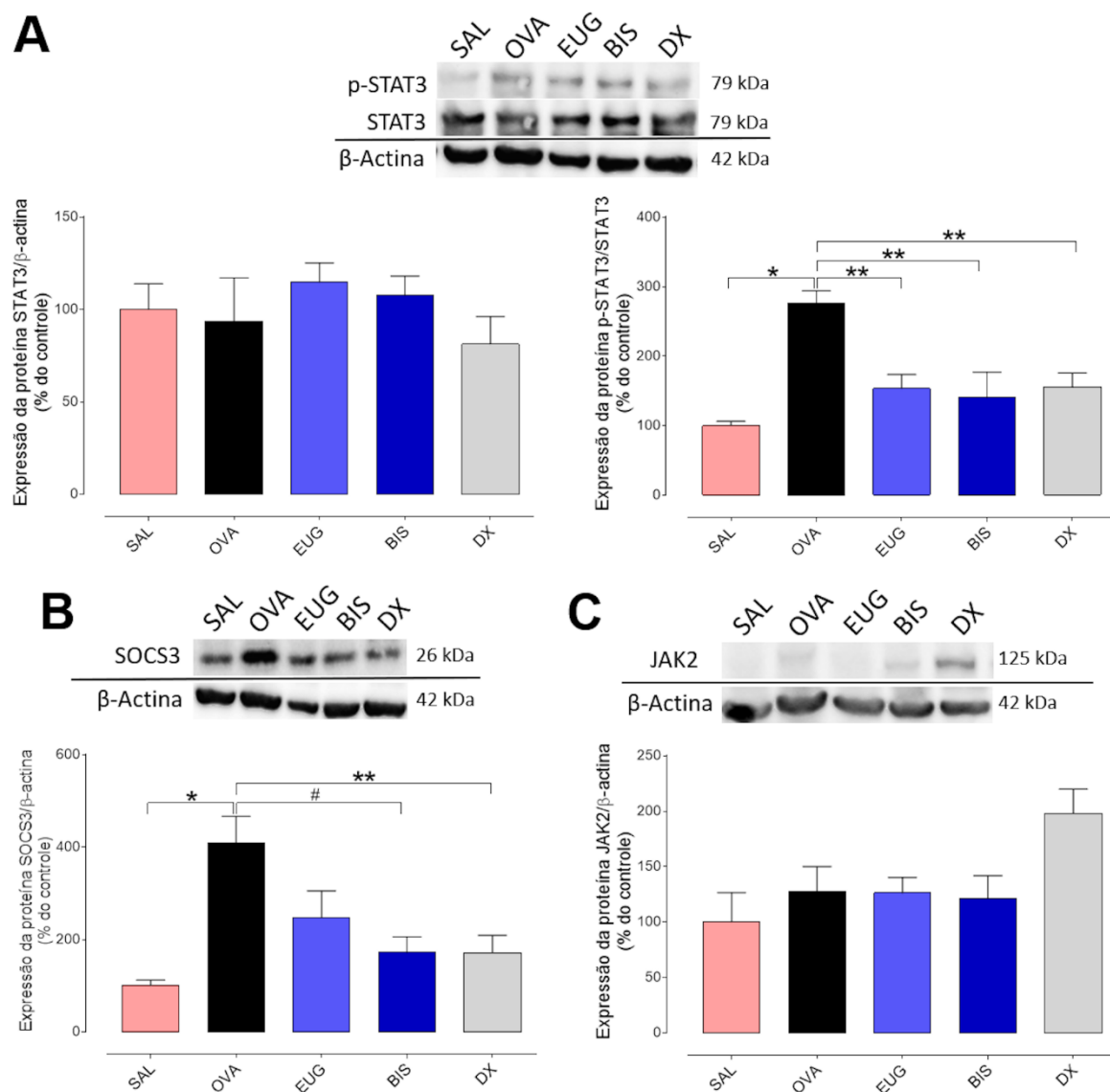


Figura 21. Efeito do eugenol (EUG) e bis-eugenol (BIS) na via JAK2/STAT3/SOCS3. (A) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína total de STAT3 e fosforilada no homogenato pulmonar. (B) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína total de SOCS3 no homogenato pulmonar (C) Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína JAK2 total. O grupo OVA aumentou o grau de fosforilação da STAT3 e expressão da SOCS3, o grupo tratado com BIS reduziu ambas as proteínas, assim como o grupo tratado com DX. # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média  $\pm$  EPM, n de 5 a 7 animais por grupo.

#### 4.2.7 O bis-eugenol reduz a expressão de VACHT no pulmão de animais com asma experimental

Ao avaliarmos a expressão dos níveis da proteína VACHT no pulmão, observamos que houve aumento no grupo sensibilizado quando comparado ao seu controle SAL ( $p<0,001$ ). Os tratamentos com o BIS e ( $p<0,001$ ) e DX ( $p<0,01$ ) foram eficientes para reduzir a expressão dessa proteína. Esse efeito não foi observado no grupo tratado com EUG (Figura 22).

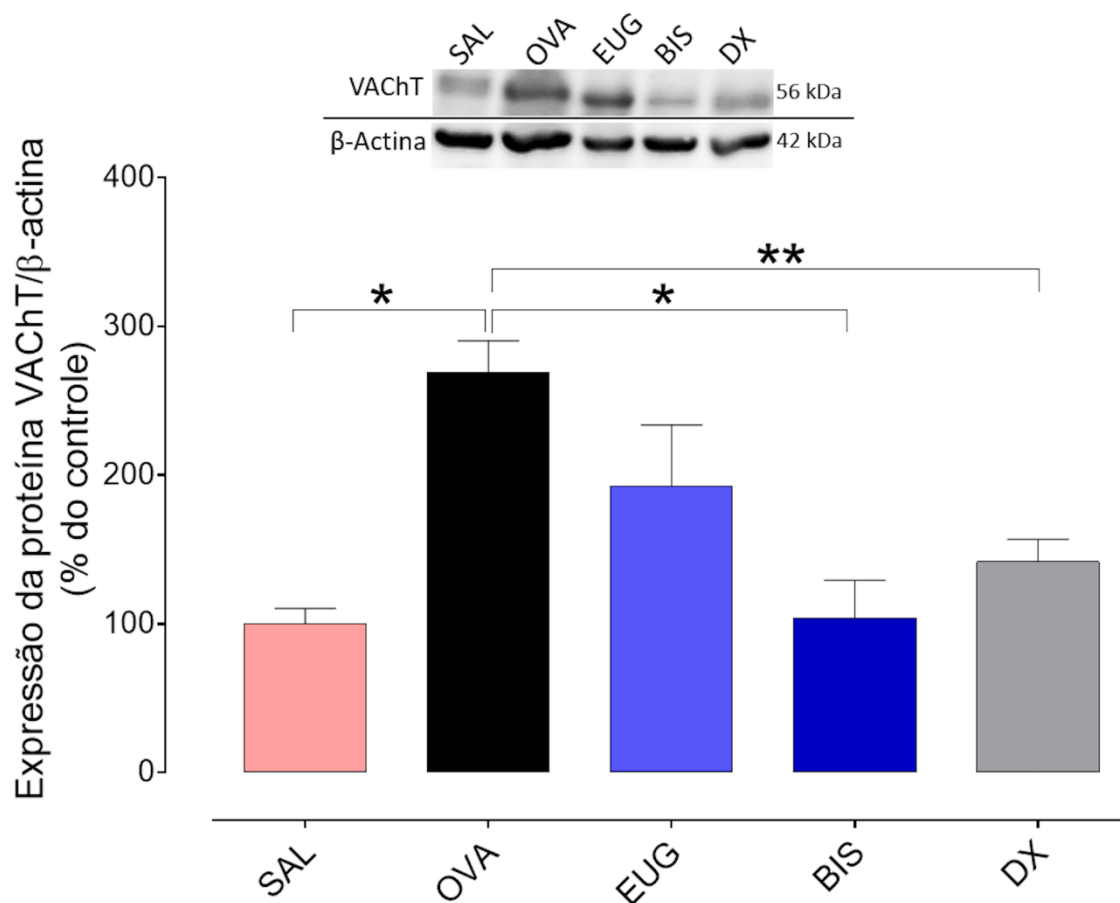


Figura 22. Bis-eugenol (BIS) reduziu a expressão da proteína VACHT no homogenato pulmonar. Imagem representativa da intensidade das bandas e expressão da proteína VACHT. O grupo OVA aumentou a expressão desta proteína, os grupos tratados com BIS e DX reduziram a expressão de VACHT, enquanto esse efeito não foi observado no grupo tratado com EUG. \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,001$ . Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, n de 5 a 7 animais por grupo.



#### 4.2.8 Eugenol e bis-eugenol não induzem toxicidade in vitro em células RAW 264,7

Para avaliar a toxicidade do eugenol e bis-eugenol, foram utilizadas células da linhagem RAW 264,7 e uma curva dose de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  de cada composto para medir a viabilidade celular. Não houve diferença estatística em nenhuma das doses estudadas, demonstrando que nessas doses esses componentes não apresentam uma ação tóxica à célula (Figura 23).

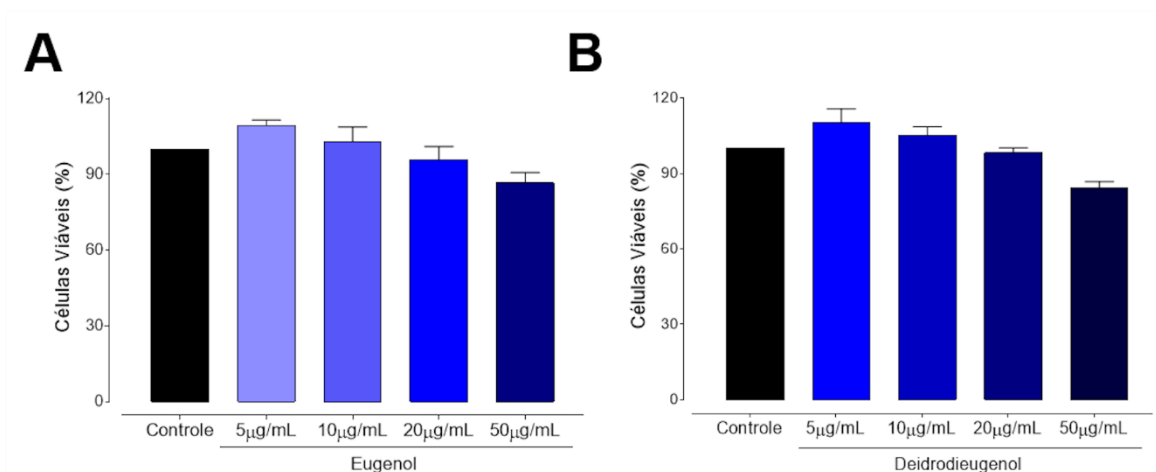


Figura 23. Viabilidade celular em diferentes doses de (A) eugenol e (B) bis-eugenol (deidrodieugenol) em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264,7. Não houve diferença em nenhuma dose estudada e em nenhum dos compostos em relação ao controle. Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, em cada grupo foi utilizado um pull de células em duplicata.

#### 4.2.9 Eugenol e bis-eugenol inibem a liberação de radicais livres

Para avaliarmos se o óleo essencial eugenol e seu dímero, bis-eugenol, atuam na captura de radicais livres, foi utilizado o método de DPPH com as doses de 1 a 500  $\mu\text{g/mL}$  de controle positivo ácido gálico e dos compostos. Ambos os compostos apresentaram atividade na captura de radicais livres, no entanto o eugenol apresentou essa inibição em concentrações menores que o bis-eugenol (Figura 24).

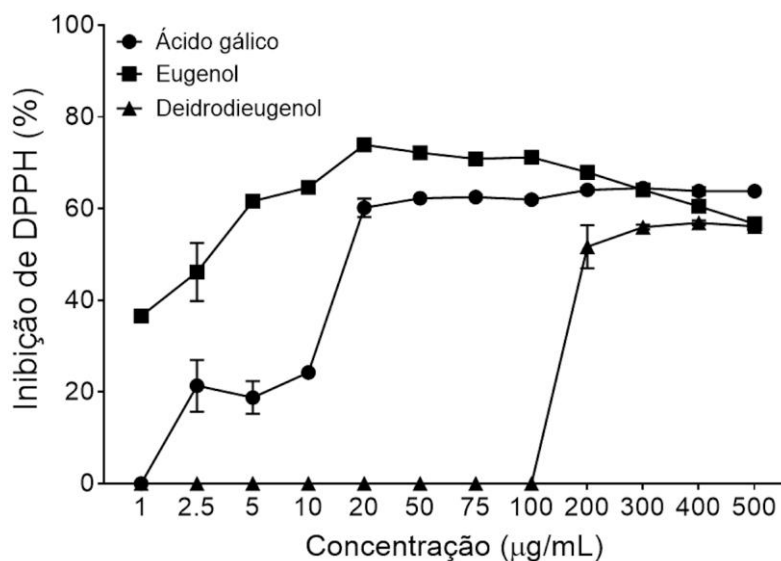


Figura 24. Porcentagem de inibição de radicais livres dos compostos eugenol e bis-eugenol. O eugenol apresentou uma atividade da captura de radicais livres em concentrações mais baixas que as observadas como bis-eugenol (deidrodieugenol). Dados apresentados com Média±EPM, e foi utilizado triplicata para cada concentração.

#### 4.2.10 Eugenol e bis-eugenol reduzem a produção de NO em células RAW 264,7 estimuladas com LPS

As células da linhagem RAW 264,7 foram estimuladas com LPS para induzir a liberação de óxido nítrico (NO) e tratadas com diferentes doses de eugenol e bis-eugenol (5 a 50 µg/mL). Todas as doses de EUG e de BIS reduziram a liberação de NO quando comparado com o grupo que foi estimulado com LPS (Figura 25)

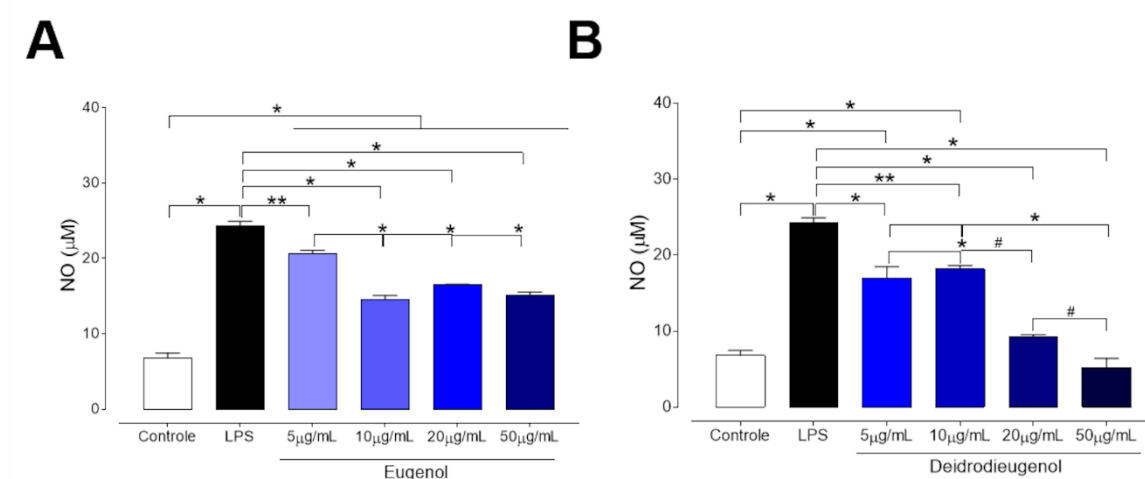


Figura 25. As doses de 5 e 50 µg/mL de (A) eugenol e de (B) bis-eugenol (deidrodieugenol) reduziram o óxido nítrico quando comparado com o grupo de células expostos ao LPS, # $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,001$ . Dados apresentados com Média±EPM, em cada grupo foi utilizado um *pull* de células em duplicata.

#### 4.2.11 Eugenol e bis-eugenol reduzem a expressão de IL-1 $\beta$ e IL-6 em células RAW 264,7 estimuladas com LPS

Considerando as citocinas pro-inflamatórias produzidas pelas células RAW 264,7 após estímulo com LPS, foram analisadas as expressões de mRNA de IL-6 e IL-1 $\beta$  nas doses de 5 a 20 µg/mL de eugenol e bis-eugenol. Ambos os compostos foram eficientes na redução das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 quando comparado com o grupo exposto ao LPS (Figura 26).

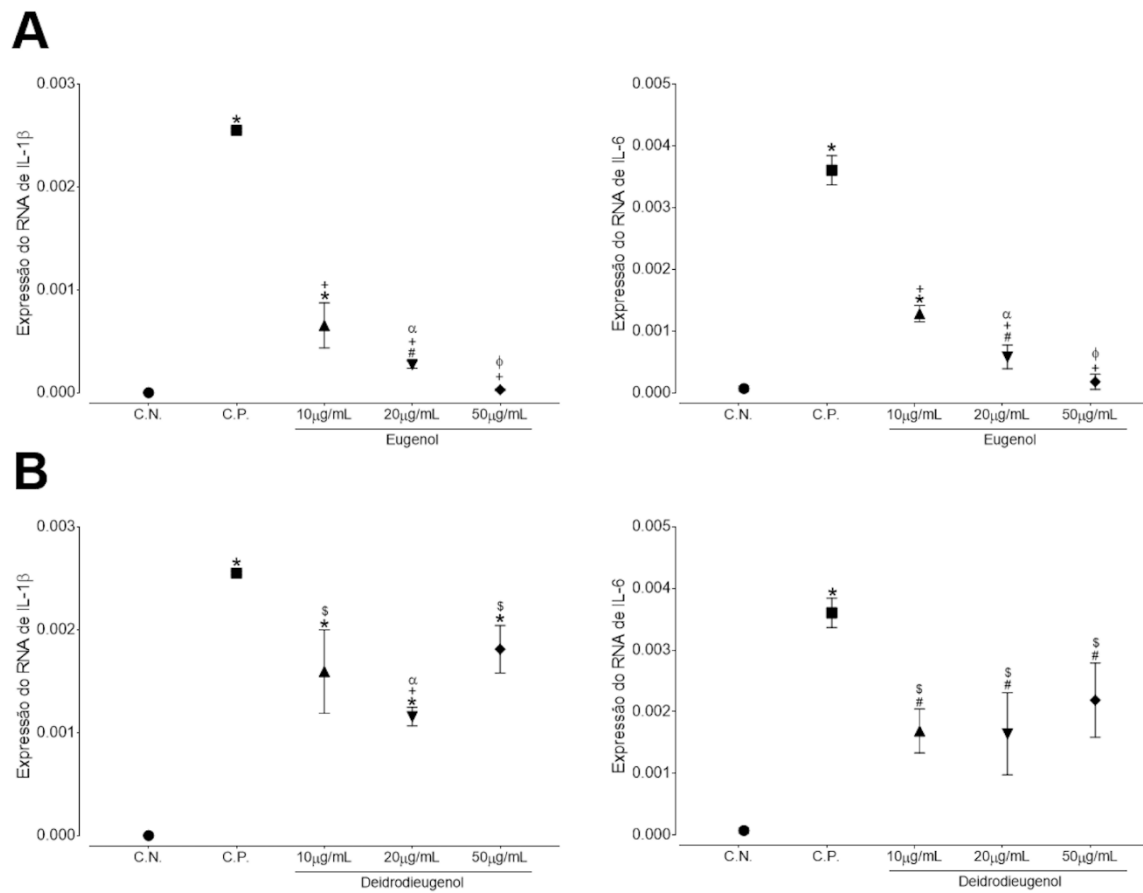


Figura 26. Todas as doses de (A) eugenol e (B) bis-eugenol (deidrodieugenol) reduziram a expressão de IL-1 $\beta$  e de IL-6 quando comparados com o controle positivo exposto a LPS; # $p < 0,05$  e \* $p < 0,001$  comparado com o grupo SAL, + $p < 0,05$  \$ $p < 0,001$  comparado com grupo OVA e  $\alpha p < 0,05$  comparado ao grupo da dose de 50  $\mu$ g/mL. Dados apresentados com Média $\pm$ EPM, em cada grupo foi utilizado um pull de células em duplicata.

## 5 Discussão

### 5.1 Subprojeto 1: Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da sakuranetina, isolada das partes aéreas de *Baccharis retusa* (Asteraceae), em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas

Esta primeira etapa do presente estudo demonstrou que a SK tem efeito anti-inflamatório na redução de eosinófilos associado a inibição de IL-17, da atividade da via da MAPK e de STAT3, além de VChT no pulmão de animais com inflamação alérgica crônica de vias aéreas. Estes achados contribuem com o melhor entendimento dos mecanismos de ação deste flavonoide, que é essencial se pensarmos na utilização como possível ferramenta terapêutica em pacientes asmáticos.

O modelo de inflamação alérgica pulmonar crônica em camundongos deste estudo foi previamente utilizado por nosso grupo de pesquisa (ARANTES-COSTA et al., 2008; TOLEDO et al., 2013). Nossos resultados confirmaram a reprodutibilidade deste modelo onde os animais sensibilizados com OVA apresentam aumento da imunoglobulina IgE no plasma sanguíneo, aumento de células no LBA como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e principalmente de eosinófilos, sendo esta última também aumentada no sangue, associada ao aumento das citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-13), RANTES, e da citocina IL-17 no pulmão. Ainda demonstramos que há ativação de MAPK, STAT3 e SOCS3 e aumento de VChT nestes animais, sugerindo que estas vias possam ser alvos terapêuticos relevantes para o tratamento da asma (Tabela 7).

Nosso grupo já havia demonstrado previamente o efeito anti-inflamatório da sakuranetina em diferentes modelos de inflamação pulmonar (BITTENCOURT-MERNAK et al., 2017; SAKODA et al., 2016; TAGUCHI et al., 2015), incluindo a asma, onde a sakuranetina foi efetiva na redução de anticorpos e da inflamação pulmonar sendo este efeito relacionado a redução de NF-KB e estresse oxidativo (TOLEDO et al., 2013).

A fim de entender o efeito da SK na quimiotaxia celular, avaliamos no presente estudo a densidade de células inflamatórias na medula, no sangue e no pulmão. A medula óssea participa fortemente da produção de células inflamatórias pelo aumento do número de células precursoras, diante da provocação de um antígeno, e o aumento de leucócitos circulantes na medula óssea é bem caracterizado em doenças sistêmicas (DENBURG, 1999). Além disso, deve-se considerar que alguns composto poderiam ter efeito citotóxico na produção de células pela medula. Não observamos alterações na produção de células pela medula óssea em nenhum dos grupos estudados.

Pacientes em crise asmática apresentam o número de eosinófilos elevados no sangue (LIMA-MATOS et al., 2018) e este se correlaciona com a gravidade da asma. Este dado de eosinofilia também é observado neste modelo, onde os eosinófilos estão aumentados no sangue periférico do grupo sensibilizado com OVA. Tanto o tratamento com o SK quanto com DX reduziram essas células no sangue. A asma tem como importante característica o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas e no tecido pulmonar (POSSA et al., 2013) e, confirmando dados de Toledo et al., (2013) observamos que a sakuranetina reduziu o número de eosinófilos no LBA assim como a DX.

O eosinófilo é um dos grandes responsáveis pela secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas de perfil Th2, que costumam estar aumentada em casos de asma alérgica (POSSA et al., 2013). Neste sentido, a SK também reduziu IL-4, IL-13 e RANTES. As citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis por estimular a produção de IgE e muco (DULLAERS et al., 2012; MANDLER et al., 1993), e também envolvido no recrutamento de mais eosinófilos para o pulmão e na persistência da resposta inflamatória. A SK reduziu IgE, o que corrobora com este quadro de inibição da resposta alérgica. Considerando a hipótese de haver um balanço de citocinas Th1/Th2 com desvio para Th2 na asma (CHEN et al., 2014), avaliamos IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e não observamos nenhum efeito nestas citocinas, embora os níveis de IgG2a, que está associado a respostas Th1 (SJÖLANDER et al., 1998), tenham aumentado nesses animais. Estes achados estão consistentes com trabalho prévio de Toledo et al., (2013), onde não houve efeito da SK nestas citocinas.

Outra citocina que vem sendo bastante estudada na fisiopatologia da asma é a IL-17. Apesar dos trabalhos associarem o aumento em IL-17 com asma grave onde há aumento de neutrófilos (HELLINGS et al., 2003; ODA et al., 2005), esta citocina também tem sido relacionada ao aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e regulação da função do músculo liso (LAJOIE-KADOCH et al., 2006; LÉTUVÉ et al., 2006). Observamos neste modelo experimental, que o tratamento com a SK reduziu os níveis de IL-17 no pulmão, efeito que não foi observado no grupo tratado com DX. Wakashin et al., (2008) sugerem que Th17 pode colaborar com o aumento da inflamação eosinofílica mediada por citocinas, tornando o efeito da SK na redução de IL-17 de extrema relevância, visto a importância da IL-17 em pacientes com asma grave (ODA et al., 2005)

A resposta imunológica incluindo a produção de anticorpos envolve os órgãos do sistema como timo e baço, onde células T são produzidas e armazenadas (BOKHARI; KHAN, 2015). Uma medida indireta da atividade destes órgãos é a massa destes em relação a massa corpórea, onde uma redução da imunidade pode ocorrer quando estes valores estão abaixo do normal ou uma exacerbação da resposta imune quando estes estão acima do normal. Neste sentido, a SK e a DX atenuaram o aumento da massa destes órgãos que ocorreu nos animais somente sensibilizados e sem tratamento, voltando aos valores basais, sugerindo assim um melhor controle da resposta imune com estes tratamentos. Poucos trabalhos na literatura fizeram estas análises, entretanto alguns autores já mostraram que o corticosteroide pode reduzir a massa destes órgãos por supressão da resposta imune (RYU et al., 2017).

Complementando o que já se sabe na literatura em relação ao efeito antiasmático da SK, avaliamos se este tratamento atenua a produção de muco, visto que esta característica de aumento de deposição de muco tem grande repercussão funcional no paciente (DUNICAN; WATCHORN; FAHY, 2018). O tratamento com SK reduziu a produção de muco ácido tanto no epitélio pulmonar quanto no epitélio nasal, além de reduzir a área do epitélio brônquico, sugerindo um controle na produção de muco e no processo de remodelamento pulmonar. Este efeito da SK na produção de muco no epitélio nasal tem grande relevância, considerando que há grande associação da crise de asma com a rinite (HUANG et al., 2017).

Diversos mecanismos de sinalização têm sido propostos para entender como os compostos fitoquímicos modulam a resposta inflamatória em diferentes modelos. Os efeitos benéficos dos flavonoides na asma são atribuídos particularmente a ação antioxidante (SANTANA et al., 2016), embora alguns estudos já sugiram que estes



compostos tem efeito direto em vias de sinalização da resposta inflamatória (LIU et al., 2015; YANG et al., 2011).

Assim, avaliamos o efeito da SK na via da MAPK neste modelo experimental. Demonstramos que a SK reduziu a fosforilação de três componentes desta via, p-38, ERK1/2 e JNK. A inibição da MAPK tem sido estudada como uma estratégia terapêutica no tratamento da asma há alguns anos (LEE et al., 2000). Interessante que a DX reduziu apenas a expressão de JNK no pulmão. Outros trabalhos corroboram a ideia de que fitoquímicos da classe dos flavonoides atuam na inibição desta via para desenvolver os efeitos anti-inflamatórios na asma (LIU et al., 2015; YANG et al., 2011). Além disso, Kim e Kang, (2016) demonstraram *in vitro* que a SK inibe a ERK1/2 e a JNK em macrófagos isolados. Os efeitos da MAPK na asma, particularmente a ERK1/2 e a p38, tem sido associado à ativação e diferenciação de eosinófilos, efeitos em células T, macrófagos e mastócitos (ALAM; GORSKA, 2011).

Outra importante via de sinalização da inflamação é a via JAK/STAT. A via JAK2/STAT3 pode também regular negativamente a ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA e/ou aumentar a atividade do supressor de citocina 3 (SOCS3), que culmina com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (VAN WESTERLOO, 2010). Entretanto, poucos estudos avaliaram esta via na fisiopatologia da asma. Mostramos que a STAT3 e SOCS3 estão aumentadas no pulmão de animais sensibilizados. Em modelo experimental de asma, Simeone-Penney et al., (2007) demonstraram que o nocaute condicional de STAT3 no epitélio das vias aéreas diminuiu o recrutamento de eosinófilos para as vias respiratórias, a liberação de citocinas Th2 no pulmão em relação aos animais sem modificação genética, o que corrobora nossos achados.

A ativação de STAT3 induzida por IL-6 está aumentada em fibroblastos derivados de asmáticos graves em relação ao controle (SALEM et al., 2018). Yang et al., (2017)

mostraram que STAT3 tem correlação com a expressão de citocinas em monócitos de pacientes asmáticos, sugerindo uma importância dessa via na fisiopatologia da asma. No presente estudo demonstramos que a SK reduziu a fosforilação de STAT3, que estava aumentada em animais sensibilizados. Gavino et al., (2016) demonstraram que a inibição da STAT3 está relacionada com a redução da liberação de IL-17; neste contexto, a SK reduziu os níveis de IL-17, podendo estar ligado com a redução da fosforilação da STAT3.

A SOCS3, embora usualmente associada a uma regulação negativo da via JAK-STAT (DE JONGE et al., 2005), tem seu papel bastante incerto na asma. Por um lado, os níveis de IgE, citocinas Th2 e o infiltrado eosinofílico no LBA estavam aumentados em animais nocautes para SOCS3 em comparação com os selvagens, sugerindo que o aumento de SOCS3 poderia ter um papel protetor (SEKI et al., 2003). Por outro lado, o aumento de SOCS3 em células T está associado à gravidade da asma (SEKI et al., 2003). Interessante, que a SK manteve os níveis de SOCS3 semelhante ao de OVA e reduziu IL-17 no pulmão, enquanto a DX reduziu SOCS3, mas manteve os níveis de IL-17 alto. Estes achados embora ainda não totalmente esclarecidos são relevantes uma vez que a STAT3 é necessária para a diferenciação de linfócitos Th17 e liberação de citocinas e tem sido associada a formas grave da asma e da persistência da inflamação de vias aéreas (GAVINO et al., 2016; HARRIS et al., 2007). Estudos futuros são necessários para esclarecimento do papel de STAT3/SOCS3 na asma.

Nosso grupo demonstrou anteriormente que a deficiência na via colinérgica anti-inflamatória em animais *knock down* para VACHT (transportador vesicular de acetilcolina), aumentou a ativação de NF-κB e reduziu a via JAK/STAT/SOCS induzindo a inflamação pulmonar (PINHEIRO et al., 2015). Outros achados da literatura também corroboram a ideia de que a via colinérgica anti-inflamatória e a

acetilcolina neuronal e não neuronal tenham papel importante na fisiopatologia da asma (DE JONGE; ULLOA, 2007). Devido a esta relação do sistema colinérgico e da via JAK/STAT/SOCS, e do efeito da SK na modulação da fosforilação de STAT3, fomos avaliar se este tratamento interfere com a expressão de VACHT no pulmão. Sabe-se que a redução de VACHT está intimamente relacionada aos níveis de ACh, o principal mediador do sistema colinérgico anti-inflamatório (PRADO et al., 2002). Observou-se que a expressão de VACHT aumentada em animais sensibilizados foi inibida pelos tratamentos com SK e DX. Nossa hipótese é de que o animal sensibilizado aumenta a expressão de VACHT no sentido de aumentar a liberação de ACh, neste sentido, considerando que os tratamentos reduziram a inflamação e o dano pulmonar, a expressão de VACHT no pulmão foi normalizada.

Obviamente é importante lembrar que estes compostos utilizados no presente estudo são potentes antioxidantes e que o fato de reduzir o estresse oxidativo pode contribuir com a melhora da resposta inflamatória na asma (MAHAPATRA; ROY, 2014; TAGUCHI et al., 2015). Entretanto, este estudo contribui com a literatura no sentido de demonstrar que este composto tem efeito também em vias importantes de sinalização celular que controlam a resposta inflamatória.

Um importante fator limitante dos estudos de compostos fitoquímicos é a correta avaliação dos efeitos tóxicos da utilização destes compostos. Usualmente, a limitação da obtenção de grande quantidade dos compostos estudados impede a realização de testes farmacológicos e toxicológicos. Mas, pensando em uma futura utilização em pacientes, é de extrema relevância avaliar possíveis efeitos tóxicos.

Neste sentido, embora esta seja uma medida bastante indireta, avaliamos a massa do fígado a fim de observar se a administração deste composto por 8 dias poderia interferir na morfologia deste órgão. A bioavaliabilidade dos flavonoides parece

depende da estabilidade hepática (DAHAN; ALTMAN, 2004; MOON; WANG; MORRIS, 2006). Não observamos diferença na massa do fígado de nenhum dos grupos estudados, e a análise histopatológica também não mostrou alterações significativas, sugerindo que a utilização da SK não induz efeitos tóxicos *in vivo*.

Ainda, avaliamos possível efeito tóxico *in vitro*, e também se há efeito direto na redução de citocinas em macrófagos RAW 264,7. Observamos que nas doses utilizadas a SK não induz morte celular. No ensaio com DPPH, que tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de um composto, a SK mostrou ter um baixo efeito antioxidante em relação ao controle ácido gálico, uma vez que a SK não foi capaz de capturar radicais livres, entretanto, ao avaliar o efeito da SK em células estimuladas com LPS, observamos redução na liberação de NO por estas células após o tratamento com SK, confirmando efeito antioxidante já bem descrito na literatura.

Os mediadores inflamatórios liberados por macrófagos estimulados são considerados fatores aceleradores da ativação de macrófagos, célula importante na resposta imune e na asma (PINHEIRO et al., 2018). Assim a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias como IL-6 e IL-1 $\beta$  em células estimuladas com LPS foi inibida pelo tratamento com SK. Em conjunto estes dados demonstram o papel anti-inflamatório da SK, além do potencial antioxidante já conhecido.

Nesta primeira etapa podemos concluir que a sakuranetina intranasal *in vivo* é eficaz na redução de IgE, no recrutamento de eosinófilos para o pulmão e na liberação de citocinas Th2 e Th17. Nossos achados ainda sugerem que as vias MAPK e STAT3 são mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da SK. A SK também reduziu os níveis pulmonares de VACHT e a liberação de citocinas *in vitro*. Em conjunto, demonstramos que este composto pode ser benéfico no controle da resposta alérgica

de vias aéreas, e pelo menos em modelo animal parece seguro sem indução de grandes efeitos hepáticos de toxicidade (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo dos dados dos efeitos do tratamento com sakuranetina no modelo experimental de asma.

Efeitos da SK <i>in vivo</i>				
		OVA	SK	DX
RESPOSTA INFLAMATÓRIA	Medula Óssea	—	—	—
	Sangue			
	Total	—	—	—
	Eosinófilos	↑	↓	↓
	Linfócitos	—	—	↓
	Monócitos e Neutrófilos	—	—	—
	LBA			
	Total	↑	↓	↓
	Eosinófilos	↑	↓	↓
	Neutrófilos	↑	—	—
	Macrófago	↑	↓	—
	Linfócitos	↑	—	↓
	Citocinas			
	IL-4	↑	↓	↓
	IL13	↑	↓	↓
	RANTES	↑	↓	↓
	IL-17	↑	↓	↑
	TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$	—	—	—
RESPOSTA IMUNE	Anticorpos			
	IgE	↑	↓	↑
	IgG1	—	—	—
	IgG2a	↑	↑	—
	Baço	↑	↓	↓
EPITÉLIO RESPIRATÓRIO	Timo	↑	↓	↓
	Epitélio brônquico			
	Área via aérea	↑	↓	↓
	Muco ácido	↑	↓	↓
	Muco neutro	—	—	—
VIAS SINALIZADORAS	Epitélio nasal			
	Muco ácido	↑	↓	↓
	Muco neutro	—	—	—
	Componentes das vias			
	p38	↑	↓	↑
	ERK1/2	↑	↓	—
	JNK	↑	↓	↓
	JAK2	—	—	↓
	STAT3	↑	↓	↓
EFEITOS <i>IN VITRO</i>	SOCS3	↑	—	↓
	V $\alpha$ ChT	↑	↓	↓
	Efeitos da SK <i>in vitro</i>			
	DPPH	—		
	Viabilidade celular	—		
		LPS	SK	
	RAW 264,7			
	NO	↑	↓	
	IL-1 $\beta$ mRNA	↑	↓	
	IL-6 mRNA	↑	↓	

## 5.2 Subprojeto 2: Avaliação das ações anti-inflamatórias e os mecanismos de ação do eugenol e de seu dímero, bis-eugenol em modelo experimental de inflamação crônica alérgica de vias aéreas

Neste segundo subprojeto, avaliamos dois compostos, eugenol (EUG) e seu dímero, o bis-eugenol (BIS) no mesmo modelo de asma utilizado no subprojeto 1. Nesta etapa nossos principais achados foram que o BIS, composto que pode ser facilmente sintetizado de forma rápida e de baixo custo (DE SOUSA et al., 2019; GRECCO et al., 2017), tem efeito de inibição de citocinas e de NO *in vitro*. No modelo de asma experimental, este composto foi efetivo na redução da inflamação e da hiperreatividade brônquica, tendo efeito melhor que o EUG. Seus mecanismos de ação parecem estar associados à inibição de mecanismos intracelular de sinalização como MAPK, STAT3 e SOCS3, além de IL-17 e do VACHT. Não detectamos efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro*.

Inicialmente testamos se o BIS apresentava algum efeito *in vitro*. Outros trabalhos de parte de nosso grupo sugerem um importante efeito biológico deste composto (DE SOUSA et al., 2019). Para tanto utilizamos macrófagos da linhagem RAW 264,7, e observamos que o tratamento com EUG e BIS não interferiram na viabilidade celular. Além disso, o teste com DPPH, que avalia a capacidade antioxidante do composto, demonstrou que ambos os compostos têm efeito antioxidante semelhante ao controle positivo ácido gálico, entretanto o BIS só apresentou efeito em doses acima de 100 µg/mL.

Ao utilizarmos células RAW 264,7 estimuladas com LPS, que sabidamente produzem NO, IL-1 $\beta$  e IL-6, observamos que tanto o EUG quanto o BIS reduziram a liberação de NO e as concentrações de citocinas liberadas particularmente nas doses mais altas (50 µg/mL). Grecco et al., (2017) já haviam testado o efeito deste composto

em células estimuladas com LPS, e observaram que ele reduz as espécies reativas de oxigênio, entretanto não reduz a liberação de nitrito por macrófagos peritoneais estimulado com LPS. Estes dados aparentemente controversos se devem a diferentes concentrações de LPS e dos compostos utilizados, assim como diferentes técnicas de mensuração das espécies reativas de oxigênio. Cabe ressaltar que o efeito destes compostos na redução de citocinas pro-inflamatória foi semelhante ao eugenol, o que nos fez testá-lo *in vivo* em modelo de asma.

O eugenol já é bem conhecido como anti-inflamatório, entretanto seu efeito na asma é bastante controverso uma vez que ele também está associado ao desenvolvimento de alergias (LÓPEZ-SÁEZ et al., 2015; PAN; DONG, 2015). Além disso, ele está presente na composição de diversas substâncias comercialmente disponíveis que podem induzir a alergia, e é bastante utilizado na área de odontologia (MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2016; QUIRCE et al., 2007). Já seu dímero, o bis-eugenol, além de ser facilmente isolado de algumas plantas, pode ser sintetizado, o que atrai o interesse como potencial ferramenta terapêutica. Além disso, usualmente, quando uma molécula é dimerizada, esta pode ter ações biológicas mais potentes, e sem tantos efeitos tóxicos (GRECCO et al., 2017).

Este é o primeiro estudo que compara o EUG e seu dímero em modelo de asma experimental. Não encontramos outros estudos que tenham avaliado o BIS em modelo de asma. Nossa hipótese ao estudar estes compostos é que a mudança da estrutura química da molécula poderia contribuir para uma maior eficácia associada à redução do efeito tóxico e às vezes associada à alergias descritas pelo eugenol. A fim de comparar estes tratamentos fitoquímicos com aqueles utilizados por pacientes, sempre utilizamos um grupo de animais tratado com corticosteroide.



Utilizando mesmo modelo de asma experimental do projeto anterior, realizamos uma curva dose resposta ao EUG considerando a quantidade de eosinófilos no pulmão e a hiperresponsividade brônquica como marcadores da eficácia da dose utilizada no presente modelo. Baseado nestes achados, escolhemos a dose de 10 mg/Kg para prosseguir os estudos *in vivo*.

Os achados referentes ao grupo OVA foram semelhantes ao descrito no subprojeto 1, mostrando que este modelo é bastante reprodutível. Além disso, o modelo utilizado também apresentou hiperresponsividade brônquica de vias aéreas e também de parênquima pulmonar. O BIS melhorou todos os parâmetros de função pulmonar, e teve efeito mais eficaz em relação ao EUG e também a DX. Considerando a hiperresponsividade brônquica presente na asma, uma das principais responsáveis pela falta de ar e sibilo observado nos pacientes, é bastante relevante demonstramos que o BIS foi efetivo na redução da hiperresponsividade brônquica, tendo um efeito melhor que o corticosteroide DX. Embora o uso de corticosteroide seja o tratamento recomendado, não interfere significativamente na melhora da broncoconstrição, sendo necessário o uso de broncodilatadores de curta e longa duração em momentos de crise (GRZELA et al., 2015). Estes dados são de extrema relevância e reforçam o potencial terapêutico desta molécula testada em modelos de asma (Tabela 8).

Foi observado uma redução de eosinófilos no grupo tratado com eugenol, concordando com os achados de Pan e Dong, (2015), que observaram uma redução de eosinófilos no LBA com a mesma dose de eugenol estudada. Cabe ressaltar que o modelo de asma utilizado é um pouco diferente do nosso, utilizando camundongos fêmeas, via de tratamento utilizado para o eugenol foi de forma oral.

Outras células inflamatórias no LBA, como macrófagos e linfócitos, aumentadas neste modelo experimental, também foram reduzidas pelos respectivos tratamentos.

É importante ressaltar que apenas o dímero de eugenol foi eficaz na redução de neutrófilos neste modelo. Embora este não seja um modelo típico de asma grave, os animais sensibilizados apresentam um aumento de neutrófilos em relação ao grupo controle. Os pacientes com asma grave que não respondem ao uso de corticoide, apresentam usualmente um fenótipo neutrofílico e/ou misto (ITO; CHUNG; ADCOCK, 2006). Desta forma, o BIS teria uma importância única se efetiva em estudos futuros em modelos de asma grave.

Sabe-se que a sensibilização é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da resposta alérgica. O tratamento com EUG e BIS não reduziram os níveis elevados de IgE dos animais sensibilizados, embora tenham reduzido IL-4, uma citocina bastante envolvida no processo de produção de IgE. Uma possível hipótese é que o BIS tenha um efeito local e sistêmico controlando a resposta inflamatória, mas não no processo de sensibilização. Deve-se ainda considerar que estes compostos foram administrados após o período de sensibilização onde os animais já possuem altos níveis de anticorpos, o que é mais próximo do que ocorre na clínica. Estes achados diferem dos encontrados com o uso da sakuranetina, uma vez que esta última reduziu os níveis de IgE no plasma. Novamente, estes achados diferem de Pan e Dong (2015) que observaram redução de IgE nas doses de eugenol de 10 e de 20 mg/Kg.

A asma alérgica frequentemente está relacionada com a liberação de citocinas de perfil Th2 (DULLAERS et al., 2012; LLOYD; HESSEL, 2010). As citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis por estimular a produção de IgE (DULLAERS et al., 2012; MANDLER et al., 1993), além disso, estão envolvidas no recrutamento de eosinófilos e na persistência da resposta inflamatória (BRUSSELLE et al., 1995; LEMANSKE; BUSSE, 2010; LUKACS et al., 1994; ZHU et al., 1999). Os tratamentos com EUG e

BIS foram eficientes na redução das citocinas Th2, IL-4, IL-13, porém, não reduziram RANTES no pulmão.

Um dado bastante interessante é que o EUG e o BIS reduziram IL-17, e novamente esta citocina não foi reduzida pelo tratamento com DX. Este achado justifica a redução de neutrófilos observada com os tratamentos com bis-eugenol. Nenhum dos tratamentos reduziu citocinas de perfil Th1, entretanto os animais tratados apresentam valores menores de IL-10 no pulmão. Embora a IL-10 seja uma citocina classicamente anti-inflamatória, ela usualmente está aumentada em modelos de inflamação, na tentativa de manter a homeostasia do organismo (VIEIRA et al., 2014).

Considerando as vias de atuação do bis-eugenol, pouco se tem na literatura em relação à asma. Pan e Dong, (2015) mostraram que o eugenol inibe a inflamação via redução de NF- $\kappa$ B. Em outros modelos de inflamação, que não asma, os autores sugerem diferentes vias como MAPK (MAGALHÃES et al., 2010; SHEN et al., 2019). Desta forma, avaliamos as vias de sinalização que observamos estarem alteradas neste modelo de asma experimental. Apenas o bis-eugenol inibiu completamente a via da MAPK, reduzindo a fosforilação de p38, ERK1/2 e JNK. O eugenol reduziu apenas a p38 e a DX as proteínas ERK1/2 e JNK, sendo assim parece que o bis-eugenol tem um efeito mais importante na inibição desta via em modelo de asma alérgica.

Considerando a via STAT3/SOCS3, observou-se que o BIS, assim como a DX e o EUG, reduziram a fosforilação de STAT3, mas somente o BIS e a DX foram efetivos na inibição de SOCS3. Não houve efeito na expressão de JAK em nenhum dos grupos experimentais.

Como citado anteriormente, nosso grupo tem demonstrado a importância do sistema colinérgico no pulmão. Assim demonstramos que apenas o bis-eugenol e a

DX foram efetivos na redução de VACHT que estava aumentada nos animais sensibilizados. Devido ao fato dos níveis de VACHT terem relação aos níveis da ACh, nossa hipótese é que o aumento do VACHT tenha como objetivo um efeito de conter a resposta inflamatória. Novamente atribuímos esta resposta ao efeito do bis-eugenol no VACHT ao forte efeito anti-inflamatório desta molécula, sendo este um mecanismo que diferencia a ação do eugenol com o bis-eugenol.

Desta forma, em conjunto, nossos achados permitem concluir que o bis-eugenol é uma molécula com forte potencial terapêutico no tratamento da asma alérgica, uma vez que reduz a inflamação e melhora a função pulmonar. Este efeito não se deve somente ao efeito antioxidante desta molécula, mas também ao efeito anti-inflamatório inibindo diferentes vias de sinalização como MAPK, STAT3, além de reduzir VACHT e IL-17. O efeito desta molécula na redução de IL-17 e de neutrófilos tem grande interesse para asma grave. Este estudo possui algumas limitações. Sabe-se que estudos experimentais devem-se ter cuidado ao transpor os achados para humano. Sabe-se ainda que diversas moléculas estudadas mostram efeito biológico, mas que há um longo caminho a se chegar na utilização clínica. Por fim, um estudo mais aprofundado na parte de remodelamento pulmonar pode trazer mais contribuições aos achados do presente estudo.

Tabela 8. Resumo dos dados dos efeitos do tratamento com eugenol e bis-eugenol no modelo experimental de asma.

Efeitos do EUG E BIS <i>in vivo</i>					
		OVA	EUG	BIS	DX
RESPOSTA INFLAMATÓRIA	Medula Óssea	—	—	—	—
	Sangue				
	Total	—	—	—	↓
	Polimorfonucleares	↑	↓	—	—
	Mononucleares	—	—	—	—
	LBA				
	Total	↑	↓	↓	↓
	Eosinófilos	↑	↑	↓	↓
	Neutrófilos	↑	—	↓	—
	Macrófago	↑	—	↓	↓
	Linfócitos	↑	↓	↓	↓
	Citocinas				
	IL-4	↑	↓	↓	↓
	IL13	↑	↓	↓	↓
	RANTES	↑	—	—	↓
	IL-17	↑	↓	↓	↑
	IL-6	↑	—	—	—
	IL-10	—	↓	↓	—
	Th1: TNF-α e IFN-γ	—	—	—	—
RESPOSTA IMUNE	Anticorpos				
	IgE	↑	—	—	—
	IgG1	↑	↑	↑	↑
	IgG2a	↑	↑	—	—
	Baço	↑	↓	↓	↓
FUNÇÃO PULMONAR	Timo	↑	↓	↓	↓
	Sistema respiratório				
	Rrs	↑	↓	↓	↑
	Ers	↑	—	↓	—
	Tecido pulmonar				
	Gtis	↑	↓	↓	—
VIAS SINALIZADORAS	Htis	—	—	—	—
	Raw	↑	—	↓	—
	Componentes das vias				
	p38	↑	—	↓	—
	ERK1/2	↑	—	↓	↓
	JNK	↑	—	↓	↓
	JAK2	—	—	—	—
	STAT3	↑	↓	↓	↓
EFEITOS <i>IN VITRO</i>	SOCS3	↑	—	↓	↓
	VACHT	↑	—	↓	↓
	Efeitos do EUG e BIS <i>in vitro</i>				
	DPPH		↓		↓
	Viabilidade celular		—		—
		LPS	EUG	BIS	
	RAW 264,7	—	—		—
	NO	↑	↓		↓
	IL-1β mRNA	↑	↓		↓
	IL-6 mRNA	↑	↓		↓

## 6 Conclusão

Em conclusão demonstramos que a sakuranetina atenua a inflamação pulmonar por inibição de IL-17, da fosforilação de STAT3 e da via MAPK no pulmão de animais sensibilizados. Ainda, demonstramos que o bis-eugenol apresentou um efeito melhor em relação ao eugenol e a dexametasona, reduzindo a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de neutrófilos, e também a hiperresponsividade brônquica. Os efeitos do bis-eugenol estão associados à inibição de IL-17, da fosforilação de STAT3 e de SOCS3, das vias da MAPK e da redução de VAcHT, um componente do sistema colinérgico anti-inflamatório. Por fim, demonstramos claramente que as vias MAPK, STAT3, e também o VAcHT são alvos importantes envolvidos na fisiopatologia da asma. Em conjunto estes dados sugerem que as moléculas testadas, sakuranetina e bis-eugenol, são ferramentas com potencial terapêutico no tratamento da asma, e que os mesmos atuam em diferentes vias de sinalização para conter a resposta inflamatória pulmonar.

## Referências

- AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, out. 2016.
- AKKOC, TUNC, ET AL. Increased activation-induced cell death of high IFN- $\gamma$ -producing TH1 cells as a mechanism of TH2 predominance in atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 3, p. 652–658.e1, mar. 2008.
- ALAM, R.; GORSKA, M. M. Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 41, n. 2, p. 149–59, fev. 2011.
- ALLEN, J. E. et al. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 455–65, out. 2009.
- ARANTES-COSTA, F. M. et al. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. **Toxicologic pathology**, v. 36, n. 5, p. 680–6, 22 jul. 2008.
- ATSUMI, T. et al. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. **Anticancer research**, v. 20, n. 4, p. 2519–24, 2000.
- AUN, M. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of Asthma and Allergy**, v. Volume10, p. 293–301, nov. 2017.
- AZAMBUJA, W. **Eugenol - Óleos Essenciais | O Guia do Brasil**.
- BATEMAN, E. D. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **The European respiratory journal**, v. 31, n. 1, p. 143–78, 1 jan. 2008.
- BATES, J. H.; DARÓCZY, B.; HANTOS, Z. A comparison of interrupter and forced oscillation measurements of respiratory resistance in the dog. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 72, n. 1, p. 46–52, jan. 1992.
- BHATTACHARJEE, A. et al. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. **Free radical biology & medicine**, v. 54, p. 1–16, jan. 2013.
- BITTENCOURT-MERNAK, M. I. et al. Prophylactic and therapeutic treatment with the flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 2, p. L217–L230, fev. 2017.
- BLALOCK, J. E. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 6, p. F25-8, 18 mar. 2002.
- BOKHARI, J.; KHAN, M. R. Evaluation of anti-asthmatic and antioxidant potential of Boerhavia procumbens in toluene diisocyanate (TDI) treated rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 172, p. 377–85, 22 ago. 2015.
- BRANNAN, J. D. Bronchial hyperresponsiveness in the assessment of asthma control: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. **Chest**, v. 138, n. 2 Suppl, p. 11S–17S, ago. 2010.
- BROMBERG, J. F. Activation of STAT proteins and growth control. **BioEssays**, v. 23, n. 2, p. 161–169, jan. 2001.
- BRUSSELLE, G. et al. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. **American Journal of Respiratory Cell and**

**Molecular Biology**, v. 12, n. 3, p. 254–259, mar. 1995.

CAI, B. et al. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1599–608, 13 ago. 2015.

CDC. **Most Recent Asthma Data | CDC**. Disponível em:

<[https://www.cdc.gov/asthma/most\\_recent\\_data.htm](https://www.cdc.gov/asthma/most_recent_data.htm)>. Acesso em: 27 fev. 2019.

CHEN, S.-M. et al. Astragalus membranaceus modulates Th1/2 immune balance and activates PPAR $\gamma$  in a murine asthma model. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 92, n. 5, p. 397–405, out. 2014.

CHIALDA, L. et al. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases differentially regulate costimulated T cell cytokine production and mouse airway eosinophilia. **Respiratory research**, v. 6, n. 1, p. 36, 15 abr. 2005.

CHRISTIANSON, C. A.; ALAM, R. Mechanisms of sustained signalling in asthma. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 13, n. 1, p. 100–5, fev. 2013.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–37, 16 dez. 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

DAHAN, A.; ALTMAN, H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance. **European journal of clinical nutrition**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 15 jan. 2004.

DATASUS. **DATASUS**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

DE JONGE, W. J. et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. **Nature immunology**, v. 6, n. 8, p. 844–51, 17 ago. 2005.

DE JONGE, W. J.; ULLOA, L. The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 7, p. 915–29, ago. 2007.

DE SOUSA, F. S. et al. Genotoxic and cytotoxic effects of neolignans isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae). **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 55, p. 116–123, mar. 2019.

DENBURG, J. The nose, the lung and the bone marrow in allergic inflammation. **Allergy**, v. 54 Suppl 57, p. 73–80, 1999.

DONG, C.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A. MAP kinases in the immune response. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 55–72, abr. 2002.

DOS SANTOS, T. M. et al. Effect of Anti-IL17 Antibody Treatment Alone and in Combination With Rho-Kinase Inhibitor in a Murine Model of Asthma. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1183, 5 set. 2018.

DULLAERS, M. et al. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 3, p. 635–645, mar. 2012.

DUNICAN, E. M.; WATCHORN, D. C.; FAHY, J. V. Autopsy and Imaging Studies of Mucus in Asthma. Lessons Learned about Disease Mechanisms and the Role of Mucus in Airflow Obstruction. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 15, n. Supplement\_3, p. S184–S191, nov. 2018.

ERNST, P.; SUISSA, S. Systemic effects of inhaled corticosteroids. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 18, n. 1, p. 85–9, jan. 2012.



- FRANCO, I. J. **Ervas E Plantas A Medicina Dos Simples - Vozes - Livrarias Curitiba**. [s.l.: s.n.].
- FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Regulatory mechanisms of acetylcholine synthesis and release by T cells. **Life sciences**, v. 91, n. 21–22, p. 981–5, 27 nov. 2012.
- FUNAGUCHI, N. et al. Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n. 8, p. 766–70, ago. 2007.
- GAVINO, A. C. et al. STAT3 inhibition prevents lung inflammation, remodeling, and accumulation of Th2 and Th17 cells in a murine asthma model. **Allergy**, v. 71, n. 12, p. 1684–1692, dez. 2016.
- GINA. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2018 update)**. Disponível em: <www.ginasthma.org>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- GIUFFRIDA, M. J. et al. Increased cytokine/chemokines in serum from asthmatic and non-asthmatic patients with viral respiratory infection. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 8, n. 1, p. 116–122, jan. 2014.
- GRECCO, S. DOS S. et al. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental parasitology**, v. 130, n. 2, p. 141–5, fev. 2012.
- GRECCO, S. S. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 24, p. 62–67, 15 jan. 2017.
- GRZELA, K. et al. Prolonged Treatment with Inhaled Corticosteroids does not Normalize High Activity of Matrix Metalloproteinase-9 in Exhaled Breath Condensates of Children with Asthma. **Archivum immunologiae et therapiarum experimentalis**, v. 63, n. 3, p. 231–7, 4 jun. 2015.
- HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annual review of physiology**, v. 71, n. 1, p. 489–507, mar. 2009.
- HAN, J. et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5173, p. 808–11, 5 ago. 1994.
- HANTOS, Z. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 72, n. 1, p. 168–78, jan. 1992.
- HARRIS, T. J. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 7, p. 4313–7, 1 out. 2007.
- HASEGAWA, T. et al. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma. **Cytokine Netw**, v. 28, n. 1, p. 8–18, 1 mar. 2017.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.
- HAWRYLOWICZ, C. M.; O’GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p. 271–283, 18 abr. 2005.
- HELLINGS, P. W. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 28, n. 1, p. 42–50, jan. 2003.
- HOLMES, A. M.; SOLARI, R.; HOLGATE, S. T. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 15–16, p.

659–670, ago. 2011.

HOPPENOT, D. et al. p-STAT6, PU.1, and NF- $\kappa$ B are involved in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients. **BMC pulmonary medicine**, v. 15, n. 1, p. 122, 14 out. 2015.

HUANG, F. et al. Association of imbalance of effector T cells and regulatory cells with the severity of asthma and allergic rhinitis in children. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 38, n. 6, p. 70–77, 1 nov. 2017.

HUANG, X. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. **International immunopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 265–71, maio 2015.

ITO, K.; CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Update on glucocorticoid action and resistance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 3, p. 522–543, mar. 2006.

JEREMIAS, I. C. et al. The Role of Acetylcholine in the Inflammatory Response in Animals Surviving Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 10, p. 6635–6643, 5 dez. 2016.

KESKIN, O. et al. Exhaled RANTES and interleukin 4 levels after exercise challenge in children with asthma. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 109, n. 5, p. 303–8, nov. 2012.

KIM, H.; BERNSTEIN, J. A. Air pollution and allergic disease. **Current allergy and asthma reports**, v. 9, n. 2, p. 128–33, mar. 2009.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 7, p. 577–584, 18 jul. 2010.

KIM, K.-Y.; KANG, H. Sakuranetin Inhibits Inflammatory Enzyme, Cytokine, and Costimulatory Molecule Expression in Macrophages through Modulation of JNK, p38, and STAT1. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2016, p. 9824203, 2016.

KIMATA, M. et al. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 30, n. 4, p. 501–8, abr. 2000.

KORBES, C. V. **Manual de plantas medicinais**. 48. ed. [s.l.: s.n.].

KUJIME, K. et al. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 6, p. 3222–8, 15 mar. 2000.

LAGO, J. H. G. et al. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 3, p. 3570–95, 24 mar. 2014.

LAJOIE-KADOCH, S. et al. TNF- and IFN- inversely modulate expression of the IL-17E receptor in airway smooth muscle cells. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 6, p. L1238–L1246, 1 jun. 2006.

LEE, J. C. et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2–3, p. 185–201, maio 2000.

LEMANSKE, R. F.; BUSSE, W. W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S95-102, fev. 2010.

LÉTUVÉ, S. et al. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung

fibroblasts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 3, p. 590–596, mar. 2006.

LI, Y. et al. Salvianolic acids enhance cerebral angiogenesis and neurological recovery by activating JAK2/STAT3 signaling pathway after ischemic stroke in mice. **Journal of neurochemistry**, v. 143, n. 1, p. 87–99, out. 2017.

LIMA-MATOS, A. et al. Eosinophilic asthma, according to a blood eosinophil criterion, is associated with disease severity and lack of control among underprivileged urban Brazilians. **Respiratory medicine**, v. 145, p. 95–100, dez. 2018.

LIU, Y.-N. et al. Galangin attenuates airway remodelling by inhibiting TGF- $\beta$ 1-mediated ROS generation and MAPK/Akt phosphorylation in asthma. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11758, 9 dez. 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 838–48, 9 dez. 2010.

LOISEL, D. A. et al. Genetic associations with viral respiratory illnesses and asthma control in children. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, n. 1, p. 112–124, jan. 2016.

LÓPEZ-SÁEZ, M. P. et al. Occupational asthma and dermatitis induced by eugenol in a cleaner. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 25, n. 1, p. 64–5, 2015.

LU, Y. et al. JAK/STAT and PI3K/AKT Pathways Form a Mutual Transactivation Loop and Afford Resistance to Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes. **Original Paper Cell Physiol Biochem**, v. 21, p. 305–314, 2008.

LUKACS, N. W. et al. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 10, n. 5, p. 526–532, maio 1994.

LV, H. et al. Serum IL-17 & eotaxin levels in asthmatic patients with allergic rhinitis. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 32, n. 3, p. 700–4, 2016.

MAGALHÃES, C. B. et al. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 108, n. 4, p. 845–51, abr. 2010.

MAHAPATRA, S. K.; ROY, S. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and Ocimum gratissimum Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S391–S397, set. 2014.

MALASPINAS, I. et al. Blockade of the cholinergic system during sensitization enhances lung responsiveness to allergen in rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 45, n. 12, p. 1293–1301, dez. 2018.

MANDLER, R. et al. IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 2, p. 407–18, 15 jan. 1993.

MARTÍNEZ-HERRERA, A. et al. Effect of 4-Allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (Eugenol) on Inflammatory and Apoptosis Processes in Dental Pulp Fibroblasts. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 9371403, 2016.

MAUAD, T.; BEL, E. H.; STERK, P. J. Asthma therapy and airway remodeling. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 120, n. 5, p. 997–1009; quiz 1010–1, nov. 2007.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and

carcinogen metabolism. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 20, n. 2, p. 187–210, mar. 2006.

MOORE, P. E. et al. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 282, n. 4, p. L847-53, abr. 2002.

MORALES, J. K. et al. Mast cell homeostasis and the JAK–STAT pathway. **Genes & Immunity**, v. 11, n. 8, p. 599–608, 10 dez. 2010.

MURAKAMI, Y. et al. Preventive effect of bis-eugenol, a eugenol ortho dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 1061–1066, set. 2003.

MURPHY, D. M.; O'BYRNE, P. M. Recent Advances in the Pathophysiology of Asthma. **Chest**, v. 137, n. 6, p. 1417–1426, jun. 2010.

MURRAY, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 5, p. 2623–9, 1 mar. 2007.

ODA, N. et al. Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 1, p. 12–8, 1 jan. 2005.

ORDOÑEZ, C. L. et al. Mild and Moderate Asthma Is Associated with Airway Goblet Cell Hyperplasia and Abnormalities in Mucin Gene Expression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 2, p. 517–523, fev. 2001.

PAN, C.; DONG, Z. Antiasthmatic Effects of Eugenol in a Mouse Model of Allergic Asthma by Regulation of Vitamin D3 Upregulated Protein 1/NF-κB Pathway. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1385–93, 16 ago. 2015.

PINHEIRO, A. J. M. C. R. et al. Punica granatum L. Leaf Extract Attenuates Lung Inflammation in Mice with Acute Lung Injury. **Journal of immunology research**, v. 2018, p. 6879183, 2018.

PINHEIRO, N. M. et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120441, 27 mar. 2015.

PINHEIRO, N. M. et al. Acute lung injury is reduced by the α7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 31, n. 1, p. 320–332, jan. 2017.

PODDER, B. et al. Cytoprotective effect of kaempferol on paraquat-exposed BEAS-2B cells via modulating expression of MUC5AC. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 37, n. 9, p. 1486–94, 2014.

POSSA, S. S. et al. Eosinophilic Inflammation in Allergic Asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 46, 2013.

PRADO, C. M. et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 457–65, out. 2006.

PRADO, M. A. M. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry international**, v. 41, n. 5, p. 291–9, nov. 2002.

PU, Q. et al. TRPC1 intensifies house dust mite-induced airway remodeling by facilitating epithelial-to-mesenchymal transition and STAT3/NF-κB signaling. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, p. fj201801085R, 1 ago. 2018.

- QUIRCE, S. et al. Occupational asthma and rhinitis caused by eugenol in a hairdresser. **Allergy**, v. 0, n. 0, p. 070817172859002–???, ago. 2007.
- RODRIGUES, A. P. D. et al. A plant proteinase inhibitor from enterolobium contortisiliquum attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in a mouse model of asthma. **Histology and histopathology**, p. 18059, 8 nov. 2018.
- ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 56, n. 10, p. 402–8, 18 out. 2007.
- RÖNMARK, E. et al. Obesity increases the risk of incident asthma among adults. **The European respiratory journal**, v. 25, n. 2, p. 282–8, 1 fev. 2005.
- ROUSE, J. et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1027–37, 23 set. 1994.
- RYU, J. H. et al. Reduction of Asthmatic Parameters by Sea Hare Hydrolysates in a Mouse Model of Allergic Asthma. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 699, 5 jul. 2017.
- SAKODA, C. P. P. et al. Sakuranetin reverses vascular peribronchial and lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic pulmonary inflammation. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 6, p. 615–624, jul. 2016.
- SALEM, I. H. et al. A shift in the IL-6/STAT3 signalling pathway imbalance towards the SHP2 pathway in severe asthma results in reduced proliferation process. **Cellular signalling**, v. 43, p. 47–54, mar. 2018.
- SANTANA, F. P. R. et al. Evidences of Herbal Medicine-Derived Natural Products Effects in Inflammatory Lung Diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 2348968, 2016.
- SANTANA, F. P. R. et al. Vesicular acetylcholine transport deficiency potentiates some inflammatory responses induced by diesel exhaust particles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 167, p. 494–504, 15 jan. 2019.
- SBPT. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. **J Bras Pneumol.**, v. 38, p. S1–S46, 2012.
- SCHLEIMER, R. P. et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 148, n. 4, p. 1086–92, fev. 1992.
- SEKI, Y. et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. **Nature Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1047–1054, 29 ago. 2003.
- SHEA-DONOHUE, T. et al. Enteric pathogens and gut function: Role of cytokines and STATs. **Gut Microbes**, v. 1, n. 5, p. 316–324, set. 2010.
- SHEN, D.-S. et al. Aspirin eugenol ester inhibits agonist-induced platelet aggregation in vitro by regulating PI3K/Akt, MAPK and Sirt 1/CD40L pathways. **European journal of pharmacology**, 21 fev. 2019.
- SHI, Q. et al. A Flavonoid Glycoside Compound from *Murraya paniculata* (L.) Interrupts Metastatic Characteristics of A549 Cells by Regulating STAT3/NF-κB/COX-2 and EGFR Signaling Pathways. **The AAPS journal**, v. 19, n. 6, p. 1779–1790, 25 nov. 2017.
- SHI, Y. et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway remodeling in a murine model of asthma. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 1204–1208, abr. 2014.
- SHICHIJO, M. et al. Inhibition of syk activity and degranulation of human mast cells by flavonoids. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 12, p. 1685–90, dez. 2003.
- SIMEONE-PENNEY, M. C. et al. Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation

in a murine model of asthma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 10, p. 6191–9, 15 maio 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.].

SJÖLANDER, A. et al. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 8, p. 3949–57, 15 abr. 1998.

SOUTHWORTH, T. et al. PI3K, p38 and JAK/STAT signalling in bronchial tissue from patients with asthma following allergen challenge. **Biomarker Research**, v. 6, n. 1, p. 14, 11 dez. 2018.

STENFORS, N. et al. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. **The European respiratory journal**, v. 23, n. 1, p. 82–6, jan. 2004.

SUN, P. et al. Involvement of MAPK/NF-κB signaling in the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in experimental colitis by chronic vagus nerve stimulation. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e69424, 2 ago. 2013.

SUN, W. et al. MBD2-mediated Th17 differentiation in severe asthma is associated with impaired SOCS3 expression. **Experimental Cell Research**, v. 371, n. 1, p. 196–204, out. 2018.

TAGUCHI, L. et al. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-κB, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 79, 30 dez. 2015.

TIBÉRIO, I. F. et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 155, n. 5, p. 1739–47, maio 1997.

TOLEDO, A. et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 7, p. 1736–1749, abr. 2013.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–9, 19 dez. 2002.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 2, p. 289–96, 1 fev. 2007.

TSE, K.; HORNER, A. A. Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited. **Current allergy and asthma reports**, v. 8, n. 6, p. 475–83, nov. 2008.

VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. **Oncogene**, v. 32, n. 21, p. 2601–2613, maio 2013.

VALE, K. Targeting the JAK-STAT pathway in the treatment of “Th2-high” severe asthma. **Future medicinal chemistry**, v. 8, n. 4, p. 405–19, mar. 2016.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 27, n. 1, p. 693–733, abr. 2009.

VAN WESTERLOO, D. J. The vagal immune reflex: a blessing from above. **Wiener medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 160, n. 5–6, p. 112–7, mar. 2010.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. GÊNERO *Baccharis* (ASTERACEAE): ASPECTOS QUÍMICOS, ECONÔMICOS E BIOLÓGICOS. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VIEIRA, R. P. et al. Exercise deactivates leukocytes in asthma. **International journal of**

**sports medicine**, v. 35, n. 7, p. 629–35, 20 jun. 2014.

VILLARINO, A. V et al. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 1, p. 21–7, 1 jan. 2015.

VOEHRINGER, D.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 Immunity Reflects Orchestrated Recruitment of Cells Committed to IL-4 Production. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 267–277, mar. 2004.

WAKASHIN, H. et al. IL-23 and Th17 Cells Enhance Th2-Cell-mediated Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 178, n. 10, p. 1023–1032, 15 nov. 2008.

WESSLER, I. K.; KIRKPATRICK, C. J. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 423–34, dez. 2001.

WHO. **WHO | Asthma**. Disponível em: <<https://www.who.int/respiratory/asthma/scope/en/>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

XU, L. et al. Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF- $\kappa$ B activation pathway. **Immunology Letters**, v. 121, n. 1, p. 74–83, 16 nov. 2008.

YANG, J. et al. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- $\kappa$ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, n. 1–2, p. 29–40, 13 maio 2011.

YANG, Q. et al. STAT3 regulates cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from asthma patients. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 63, n. 9, p. 71–74, set. 2017.

YIN, Y.; LIU, W.; DAI, Y. SOCS3 and its role in associated diseases. **Human immunology**, v. 76, n. 10, p. 775–80, out. 2015.

YU, H. S. et al. Protease allergens induce the expression of IL-25 via Erk and p38 MAPK pathway. **Journal of Korean medical science**, v. 25, n. 6, p. 829–34, jun. 2010.

ZAFRA, M. P. et al. SOCS3 silencing attenuates eosinophil functions in asthma patients. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5434–51, 10 mar. 2015.

ZHANG, C. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 20, p. 13397–402, 16 maio 1997.

ZHU, Z. et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 6, p. 779–88, mar. 1999.

ZORA, J. E. et al. Associations between urban air pollution and pediatric asthma control in El Paso, Texas. **The Science of the total environment**, v. 448, p. 56–65, 15 mar. 2013.

## Anexos

## ANEXO 1- Comitê de ética em pesquisa do subprojeto 1.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO FLAVONÓIDE SAKURANETINA NA ATENUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PULMONARES EM MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL: PARTICIPAÇÃO DA VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA", protocolada sob o CEUA nº 8319281014 (ID 002666), sob a responsabilidade de **Fernanda Paula Roncon Santana e equipe; Carla Máximo Prado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 27/04/2015.

We certify that the proposal "", utilizing 32 Transgenics mice (32 males), 40 Isogenics mice (40 males), protocol number CEUA 8319281014 (ID 002666), under the responsibility of **Fernanda Paula Roncon Santana and team; Carla Máximo Prado** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/27/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2014](#) a [02/2015](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Biotério Central da FMUSP	sexo:	Machos	idade:	6 a 6 semanas
Espécie:	Camundongos transgênicos			Peso:	20 a 20 g
Linhagem:	VACHT				
Origem:	Biotério Central da FMUSP	sexo:	Machos	idade:	6 a 6 semanas
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 20 g
Linhagem:	BalB/C				

Local do experimento:

São Paulo, 01 de fevereiro de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo



## ANEXO 2- Comitê de ética em pesquisa do subprojeto 1.



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação dos mecanismos de ação do flavonóide sakuranetina na atenuação das alterações pulmonares em modelo de asma experimental: participação da via colinérgica anti-inflamatória”** protocolo nº **105/15** sob a responsabilidade de **Carla Máximo Prado e Fernanda Paula Roncon Santana**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 01/07/2015

Vigência do Projeto	Março/2016
Espécie/linhagem	Camundongo
Nº de animais	100 SPF Balb/c 80 transgênico VACHT
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério

CEUA-FMUSP, 01 de Julho de 2015

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP  
e-mail: [ceua.fm@usp.br](mailto:ceua.fm@usp.br)

## ANEXO 3- Comitê de ética em pesquisa do subprojeto 2.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com eugenol e seu dimero bis-eugenol na resposta inflamatório em modelo de asma experimental", protocolada sob o CEUA nº 1176290317 (ID 006107), sob a responsabilidade de **Fernanda Paula Roncon Santana e equipe; Carla Máximo Prado; Rafael Cossi da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 01/09/2017.

We certify that the proposal "Effect of treatment with eugenol and its bis-eugenol dimer on the inflammatory response in an experimental asthma model", utilizing 0 Isogenics mice (I), protocol number CEUA 1176290317 (ID 006107), under the responsibility of **Fernanda Paula Roncon Santana and team; Carla Máximo Prado; Rafael Cossi da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 09/01/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [10/2017](#) a [10/2018](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Biotério Central da FMUSP](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

Linhagem: [BALB/C](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: O protocolo de asma experimental, a mecânica respiratória, a eutanásia e coleta do material será realizado no Laboratório Terapêutica Experimental - LIM 20 da Faculdade de Medicina da USP

São Paulo, 01 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## ANEXO 4- Comitê de ética em pesquisa do subprojeto 2.



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que a proposta intitulada **“EFEITO DO TRATAMENTO COM EUGENOL E SEU DÍMERO BIS-EUGENOL NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL”**, registrada com o nº **048/17**, sob a responsabilidade de **Carla Maximo Prado** e **Rafael Cossi da Silva**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 26.04.17

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-02-2017 Término: 01-02-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº de animais	<b>118</b>
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 26 de Abril de 2017

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**